

**Untersuchungen zur Wechselwirkung von  
*Listeria monocytogenes* mit Komponenten des  
Mikrofilamentsystems der Wirtszelle  
und funktionelle Charakterisierung des  
Aktin-Nukleationsfaktors ActA**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
DISSERTATION

von **Lothar Gröbe**  
aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland

2. Referent: Priv.-Doz. Dr. Dirk Heinz

eingereicht am: 24. Januar 2000

mündliche Prüfung (Disputation) am: 12. Mai 2000

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Prof. J. Wehland, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Gerstel B., Gröbe L., Pistor S., Chakraborty T. and Wehland J.

The ActA polypeptides of *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* harbor related binding sites for host microfilament proteins.

Infection and Immunity 64(6):1929-1936 (1996)

Laurent V., Loisel T.B., Harbeck B., Wehman A., Gröbe L., Jockusch B.M., Wehland J., Gertler F.B. and Carlier M.-F.

Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*.

Journal of Cell Biology 144(6):1245-1258 (1999)

## **Tagungsbeiträge**

Gröbe L., Machesky L.M., Konradt M., Pistor S. and Wehland J.

Generation and characterization of antibodies against the p21-Arc subunit of the Arp2/3 complex.

(Poster) 13. Meeting of the European Cytoskeleton Forum, Strasbourg (1998)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>.6</b>
1.1	Listerien .....	.7
1.2	Infektionszyklus und Virulenzfaktoren von Listerien .....	.8
1.3	Listerien als Modellsystem für die Aktin-vermittelte Bewegung bei Eukaryonten .....	.12
1.4	ActA akkumuliert Aktin an der Oberfläche von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	.14
1.5	VASP und Mena sind Liganden von ActA .....	.17
1.6	Der Arp2/3-Komplex initialisiert die Aktin-Akkumulation an Listerien .....	.19
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	.20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>.21</b>
2.1	Chemikalien, Antikörper und Oligonukleotide .....	.21
2.1.1	Chemikalien .....	.21
2.1.2	Primärantikörper .....	.22
2.1.3	Sekundärantikörper .....	.22
2.1.4	Reagenzien für die Fluoreszenzmikroskopie .....	.22
2.1.5	Plasmide .....	.23
2.1.6	Oligonukleotide .....	.24
2.2	Bakterienkulturen .....	.26
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> -Kulturen .....	.26
2.2.2	<i>Listeria</i> -Kulturen .....	.27
2.3	Zellkultur .....	.28
2.3.1	Zelllinien und Kulturbedingungen .....	.28
2.3.2	Transfektion von Zellkulturen .....	.29
2.3.3	Infektion von Zellkulturen mit <i>Listeria monocytogenes</i> .....	.31
2.3.4	Fluoreszenzmikroskopie .....	.32
2.4	Molekularbiologische Methoden .....	.34
2.4.1	Isolierung genomischer DNA aus Listerien .....	.34
2.4.2	Phenolisieren von DNA .....	.35
2.4.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	.36
2.4.4	Auftrennen von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese .....	.36
2.4.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	.37
2.4.6	Reinigung einer PCR-Reaktion mit dem »QIAquick PCR Purification Kit« .....	.39
2.4.7	Klonierung von PCR-Produkten .....	.39

## Inhaltsverzeichnis

2.4.8	Gerichtete Mutagenese .....	42
2.4.9	Isolierung von Plasmid-DNA .....	43
2.4.10	Sequenzierung von DNA .....	44
2.5	Biochemische Methoden .....	48
2.5.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	48
2.5.2	Coomassie-Färbung .....	49
2.5.3	Western-Blot .....	50
2.5.4	Immunfärbung und Chemolumineszenz .....	51
2.5.5	Herstellung von Extrakten aus Gewebekulturzellen .....	52
2.5.6	Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen .....	52
2.5.7	ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) .....	54
2.5.8	Subklassentest .....	55
2.6	Untersuchung der Listerien-Motilität im zellfreien System .....	55
2.6.1	Herstellung von Thrombozytenextrakten .....	55
2.6.2	Der <i>Listeria-in-vitro</i> -Motilitäts-Assay .....	57
2.6.3	Immunodepletion von VASP .....	58
2.7	Herstellung monoklonaler Antikörper .....	59
2.7.1	Immunisierung der Mäuse .....	59
2.7.2	Isolierung von Peritoneal-Makrophagen .....	59
2.7.3	Zellfusion .....	60
2.7.4	Subklonierung .....	62
2.7.5	Kultivierung im großen Maßstab .....	63
2.7.6	Reinigung monoklonaler Antikörper über Protein G .....	63
2.8	Herstellung polyklonaler Antikörper .....	64
2.8.1	Reinigung polyklonaler Antikörper über eine Affinitätsmatrix .....	64
2.9	Bestimmung der Epitope von Antikörpern .....	66
2.9.1	Bindungstest an immobilisierte Peptide .....	66
2.10	Klonierungen .....	67
3	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>70</b>
3.1	Einfluß von VASP auf die Aktin-Rekrutierung von <i>Listeria monocytogenes</i> . ...	71
3.1.1	Immunodepletion von VASP aus Thrombozytenextrakten .....	71
3.1.2	Addition von EVH1-Proteindomänen. ....	76
3.1.3	Addition der prolinreichen Repeatregion von ActA. ....	78
3.2	Sequenzierung der cDNA für den humanen Arp2/3-Komplex. ....	80

## Inhaltsverzeichnis

3.3	Herstellung spezifischer Antikörper gegen p21-Arc. ....	82
3.3.1	Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen p21-Arc. ....	83
3.3.2	Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen p21-Arc. .	85
3.3.3	Reaktion der monoklonalen und polyklonalen Antikörper mit synthetischen Peptiden. ....	86
3.4	Funktionelle Charakterisierung von ActA. ....	89
3.4.1	Charakterisierung von ActA-Konstrukten im Mitochondrien-Targeting-System. ....	90
	Deletion der Aminosäuren 163-195 bzw. 163-238 von ActA. ....	90
	Mutationsanalyse der Aktin-Nukleationsdomäne. ....	92
3.4.2	Charakterisierung von isogenen <i>Listeria actA</i> -Mutanten. ....	95
3.4.3	Verteilung von p21-Arc an der Oberfläche von <i>actA</i> -Mutanten. ....	99
3.5	Wirkung von Latrunculin B auf die Motilität von <i>Listeria monocytogenes</i> . ...	103
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>105</b>
4.1	Proteine der Ena/VASP-Proteinfamilie verstärken die Aktin-Polymerisierung auf der Oberfläche von <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	105
4.2	EVH1 und EVH2 sind zwei Proteinmodule mit unterschiedlichen Funktionen. ....	107
4.3	Die Funktion der Ena/VASP-Proteine in höheren Zellen. ....	110
4.4	Funktionelle Analyse der Aktin-Nukleationsdomäne von ActA. ....	113
4.5	Nukleation von Aktinfilamenten durch den Arp2/3-Komplex. ....	117
4.6	Die Aktin-Akkumulation an der Oberfläche von Listerien .....	122
4.7	Der Umweg von <i>Shigella flexneri</i> . ....	124
4.8	Ausblick .....	125
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>126</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>144</b>
A	Verzeichnis der Abkürzungen .....	144
B	Danksagungen .....	146
C	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen .....	147
I.	ActA .....	147
II.	Arp3 .....	150
III.	Arp2 .....	152
IV.	p41-Arc .....	154
V.	p34-Arc .....	156
VI.	p21-Arc .....	158

# 1 Einleitung

Infektionskrankheiten sind weltweit die häufigste Form menschlicher Erkrankungen. In den westlichen Industrienationen konnte durch verbesserte Hygiene und Impfprophylaxe die Gefährdung der Bevölkerung verringert werden. Der gezielte Einsatz von Antibiotika gegen Mikroorganismen hatte zur Folge, daß man in den achtziger Jahren Infektionskrankheiten bereits für besiegt hielt und deshalb in der biomedizinischen Forschung die Schwerpunkte auf organische Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs verlagerte. Wie sich in den letzten Jahren jedoch herausstellte, war diese Siegesicherheit verfrüht, denn das Auftreten von Antibiotikaresistenzen und die rasche Verbreitung solcher resistenter Stämme aufgrund der zunehmenden Mobilität der Menschen (z.B. Fernreisen), sowie das Auftreten neuer pathogener Mikroorganismen, wie der Erreger der Legionärskrankheit (*Legionella pneumophila*), verlieh der Bekämpfung mikrobieller Infektionskrankheiten neue Aktualität. Mit hohem Kostenaufwand müssen deshalb ständig neue Antibiotika entwickelt werden. Diese Entwicklung neuer Arzneimittel setzt jedoch detaillierte Kenntnisse über die Pathogenitätsmechanismen der Keime sowie der Abwehrvorgänge des Wirtsorganismus voraus.

Grundsätzlich sind zwei Gruppen bakterieller Krankheitserreger zu unterscheiden (Moulder 1985). Extrazelluläre Pathogene verbleiben nach der Infektion des Wirtsorganismus im Magen-Darm-Trakt und verursachen nach ihrer Anheftung an die Epithelzellen durch Sekretion von Toxinen oder gewebschädigenden Enzymen bereits ein Krankheitsbild. Beispiele für solche Krankheitserreger, und die von ihnen verursachten Erkrankungen sind *Bordetella pertussis* (Keuchhusten), *Corynebacterium diphtheriae* (Diphtherie) und *Vibrio cholerae* (Cholera).

Im Gegensatz dazu sind intrazelluläre Pathogene in der Lage, in die Zellen des Wirts einzudringen und sich darin zu vermehren. Sie sind dadurch vor der humoralen Immunabwehr des Wirts geschützt und widerstehen häufig der Wirkung vieler Antibiotika. Zu den intrazellulären Pathogenen werden unter anderem *Salmonella typhimurium* (Lebensmittelvergiftung), *Legionella pneumophila* (Legionärskrankheit), *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberkulose) und *Listeria monocytogenes* (Listeriose) gezählt.

### 1.1 Listerien

Listerien werden in die Gruppe der Gram-positiven, nicht sporulierenden, fakultativ anaeroben Stäbchenbakterien eingeordnet (Seeliger & Jones 1986). Sie sind in der Natur nahezu ubiquitär verbreitet und besiedeln Boden, Wasser, Pflanzen und Tiere (Weis & Seeliger 1975).

Der Gattung *Listeria* gehören sechs Spezies an. Neben der human- und tierpathogenen Art *Listeria monocytogenes* zählen die Arten *L.ivanovii*, *L.innocua*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri* und *L.murrayi* dazu. Als zweite pathogene Spezies neben *L.monocytogenes* ist *L.ivanovii* pathogen für Tiere, und stellt vor allem für Schaf- und Rinderzuchtbetriebe ein wirtschaftliches Problem dar (Seeliger & Jones 1986).

*Listeria monocytogenes* wurde 1926 als Verursacher einer Monozytose bei Kaninchen und Meerschweinchen entdeckt (Murray 1926). Beim Menschen verursacht *L.monocytogenes* die Listeriose, eine schwere Erkrankung, die sich in lokalen Entzündungen, plötzlichem Fieber sowie Kopf-, Nacken- und Rückenschmerzen äußert.

Aufgrund der Fähigkeit der Listerien die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, kann eine Infektion zu Meningitis und Enzephalitis führen. Listerien sind jedoch opportunistische Krankheitserreger und deshalb treten bei gesunden Erwachsenen Erkrankungen nur selten auf. Größere Gefahr besteht allerdings für ältere Menschen, Neugeborene und Transplantationspatienten, deren Immunsystem durch Immunsuppressiva geschwächt ist, oder für Menschen mit angeborener bzw. erworbener Immunschwächekrankheit.

Weil Listerien auch die Plazentaschranke überwinden können, sind schwangere Frauen und ihre Föten besonders gefährdet. Unerkannte Infektionen führen häufig zu Fehlgeburten oder embryonalen Schädigungen (Gellin & Broome 1989).

Eine Listerien-Infektion wird wegen der unspezifischen Symptome meistens zu spät als solche erkannt. Obwohl Listerien gegenüber den meisten Antibiotika empfindlich sind (Espaze & Reynaud 1988), ist die Behandlung in einem späten Infektionsstadium wegen der intrazellulären Verbreitung schwierig. Selbst eine gleichzeitige Verabreichung von Gentamycin und Ampicillin führt nicht immer zum Erfolg. Deshalb liegt die Sterblichkeitsrate gesicherter Listerien-Infektionen ungefähr bei einem Drittel aller Patienten (Broome *et al.* 1993).



## Einleitung

---

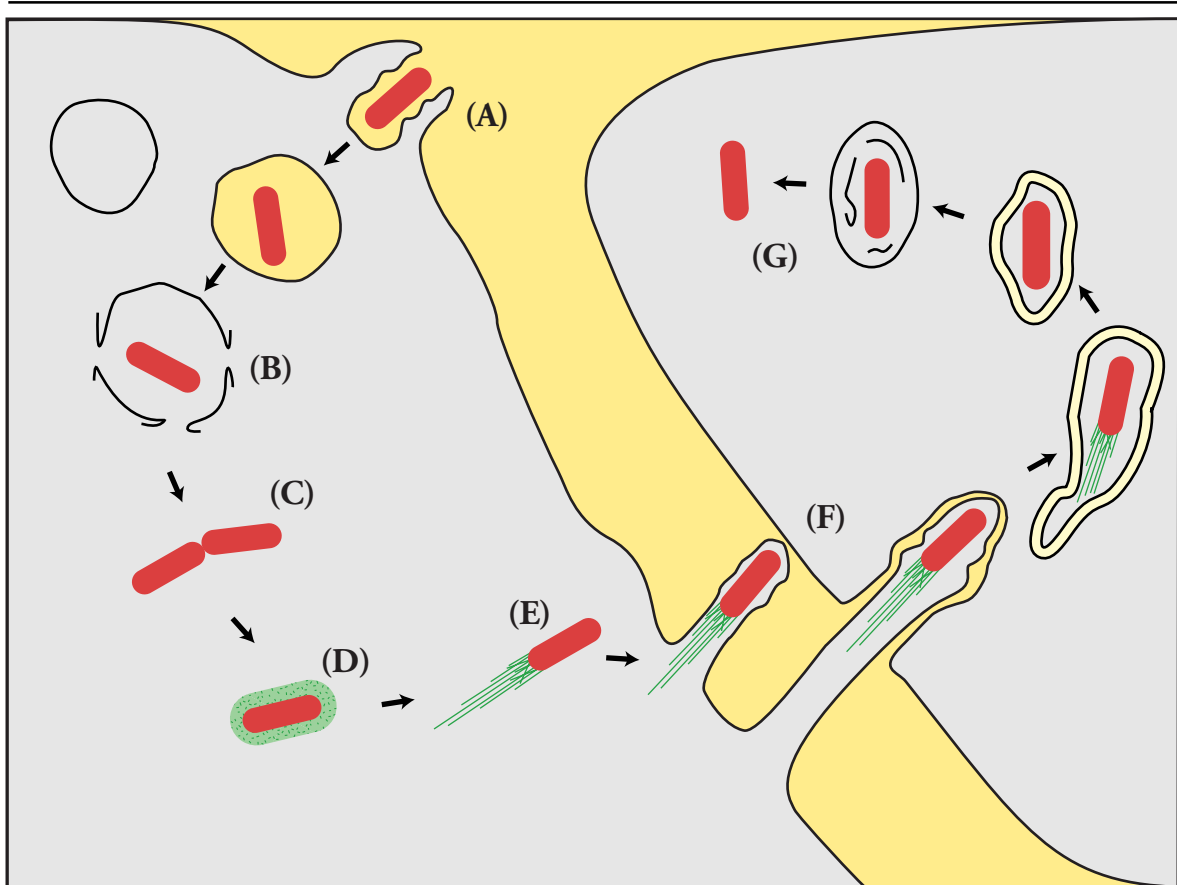
Die Infektion mit Listerien erfolgt meist oral durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel. Da sich Listerien selbst bei niedrigen Temperaturen von 4°C, hohen Salzkonzentrationen von mehr als 10% und niedrigen pH-Werten vermehren können (Junttila *et al.* 1988; Farber & Peterkin 1991), werden selbst bei sachgemäßer Konservierung und Lagerung von Lebensmitteln bedrohliche Keimzahlen erreicht. In einer amerikanischen Studie waren z.B. 20% der Weichkäse, 30% der Gemüsesorten und bis zu 50% der analysierten Fleischwaren (u.a. Pasteten) mit Listerien kontaminiert (Broome 1993).

Obwohl die Listeriose im Vergleich zu anderen Krankheiten keine Priorität besitzt, bieten sich Listerien als Modellsystem für intrazelluläre Keime an. Als anspruchslose Mikroorganismen können sie problemlos in Standardmedien gezüchtet werden. Sie weisen ein breites Wirtsspektrum auf und es können somit in der Gewebekultur verschiedenste Zelllinien infiziert werden. Mit der Maus steht ein geeignetes Tiermodell zur Verfügung. Weiterhin sind molekularbiologische Methoden wie Transposon-Mutagenese zur Erzeugung von Insertionsmutanten, Transformation mit Plasmid-DNA für Komplementationsstudien, sowie Vektorsysteme für spezifische Plasmid-Integration und homologe Rekombination etabliert. Dadurch sind gezielte genetische Manipulationen möglich, um Virulenzgene zu identifizieren und die Funktionen der betreffenden Genprodukte mit Hilfe isogener Mutanten zu untersuchen (Mengaud & Cossart 1989).

### 1.2 Infektionszyklus und Virulenzfaktoren von Listerien

Die Fähigkeit von Listerien auch Zellkulturen zu infizieren, erleichtert die Untersuchung ihres intrazellulären Verhaltens mittels Licht- und Elektronenmikroskopie. Die Bakterien zeigen dabei einen charakteristischen Zyklus verschiedener Schritte, an denen deutlich wird, welche intelligenten Wege begangen werden, um sich im Wirtsorganismus effektiv auszubreiten (Abb.1; Tilney & Portnoy 1989). Schon die Tatsache, daß Listerien nach Passage des Darmepithels von Makrophagen aufgenommen werden und in diesen überleben können, gewährleistet eine optimale Ausbreitung über die Blut- und Lymphgefäße. Listerien können jedoch nicht nur Makrophagen befallen, sondern induzieren ebenso ihre Phagozytose bei nicht-professionell phagozytierenden Zellen wie Epithelzellen oder Fibroblasten.

## Einleitung



**Abb.1:** Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*.

Während einer Infektion durchlaufen die Bakterien in den Wirtszellen einen Zyklus aus Invasion (A), Lyse des Phagolysosoms (B), Vermehrung (C), Akkumulation (D) und Reorganisation von Aktin mit intrazellulärer Fortbewegung (E), sowie Infektion einer benachbarten Zelle (F,G).

(nach Tilney & Portnoy 1989)

An der Adhäsion an die Wirtszelle und an der Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle (A) sind vor allem zwei Proteine der Internalin-Familie, das InlA und InlB, beteiligt (Gaillard *et al.* 1991; Dramsi *et al.* 1993 und 1995; Lingnau *et al.* 1995).

Die Bakterien sind nun in einem Phagosom eingeschlossen, in dem es innerhalb kurzer Zeit durch Fusion mit Lysosomen zur Ansäuerung und zur Bildung von hochreaktivem Wasserstoffperoxyd ( $H_2O_2$ ) sowie toxischen Hydroxylradikalen ( $OH\cdot$ ) kommt. Als Gegenwehr werden von den Listerien zwar Superoxyddismutasen und Katalasen gebildet, doch scheinen diese nicht essentiell für das Überleben der Erreger im Phagolysosom zu sein (Welch *et al.* 1987; Swartz *et al.* 1991). Vielmehr sekretieren die Listerien das Listeriolysin (Hly), das zu den SH-aktivierbaren hämolytischen Zytolysinen gezählt wird (Geoffroy *et al.* 1987; Chakraborty & Goebel 1988).

## Einleitung

---

Als Monomer sekretiert, lagern sich bis zu 40 der Toxinmoleküle in der phagolysosomalen Membran zusammen und bilden so hydrophile Poren, die zum Zusammenbruch des Phagolysosoms führen (B). Listeriolysin ist ein Hauptvirulenzfaktor von *Listeria monocytogenes*, da Mutanten, die einen Defekt im *hly*-Gen aufweisen, im Tiermodell avirulent sind (Gaillard *et al.* 1986; Kathariou *et al.* 1987). Neben Listeriolysin sind weitere membranschädigende Faktoren, wie die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase (PlcA), am Entkommen aus dem Phagolysosom beteiligt (Camilli *et al.* 1993).

Nun liegen die Bakterien frei im Zytoplasma vor. Hier können sich die Listerien vermehren (C). Gleichzeitig beginnen sie Aktinmoleküle aus dem Zytoplasma der Wirtszelle an ihrer Oberfläche zu akkumulieren (D). Mit dem Aktin-Nukleationsfaktor ActA wurde das listerielle Protein, das für diesen Effekt verantwortlich ist, identifiziert (Domann *et al.* 1992; Kocks *et al.* 1992).

Durch die Polymerisierung des Aktins zu Filamenten an einem Pol der Bakterienzelle wird an deren Oberfläche eine Kraft erzeugt (Mogilney & Oster 1996), welche die Listerien mit einer Geschwindigkeit bis zu 1,4  $\mu\text{m/s}$  vorantreibt (Sanger *et al.* 1992; Theriot *et al.* 1992; Cossart & Kocks 1994). Dabei bleiben die Aktinfilamente in einem Schweif zurück (E), der eine Länge bis zu 40  $\mu\text{m}$  erreicht (Dabiri *et al.* 1990). In diesem Aktinschweif sind einige Proteine des Zytoskeletts der Wirtszelle zu finden, wie z.B.  $\alpha$ -Actinin, Fimbrin, Villin und Ezrin/Radixin. Die Strukturen der Aktinfilamente haben dabei Ähnlichkeit mit dem Aktingerüst von Mikrovilli (Temm-Grove *et al.* 1994). Stoßen die Listerien bei ihrer Fortbewegung in der Wirtszelle auf die Plasmamembran, werden Ausstülpungen (»Protrusions«) induziert (F), welche von benachbarten Zellen phagozytiert werden. In der Nachbarzelle sind die Listerien dann von einer Doppelmembran umgeben. Am Entkommen aus dieser Doppelmembran ist unter anderem eine weitere Phospholipase, die Lecithinase (PlcB) beteiligt (Vazquez-Boland *et al.* 1992). Die Bakterien liegen nun wieder frei im Zytoplasma vor, und ein neuer Zyklus beginnt (G).

Da Listerien bei diesem Verbreitungsweg nicht mehr in den extrazellulären Raum gelangen, sind sie von einigen Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus, wie z.B. zirkulierenden Antikörpern, dem Komplementsystem und neutrophilen Granulozyten nicht mehr angreifbar. Eine Abwehr der Infektion ist nur noch durch eine zellvermittelte Immunantwort möglich.

## Einleitung

ActA stellt neben Hly einen weiteren Hauptvirulenzfaktor dar, da isogene *actA*-Mutanten nicht mehr in der Lage sind, Aktin an der Oberfläche zu akkumulieren, sich nicht mehr von Zelle zu Zelle ausbreiten können und deshalb im Mausinfektionsmodell avirulent sind (Domann *et al.* 1992; Kocks *et al.* 1992).

Die Gene der erwähnten Pathogenitätsfaktoren, mit Ausnahme der Internaline, liegen auf dem Chromosom von *Listeria monocytogenes* in einer Operonstruktur vor (Übersicht bei: Portnoy *et al.* 1992). In diesem Virulenzgencluster (Abb.2) liegt auch das Gen für einen positiven Regulationsfaktor (PrfA). PrfA reguliert die Expression aller genannten Virulenzgene (Leimeister-Wächter *et al.* 1990; Mengaud *et al.* 1991; Chakraborty *et al.* 1992; Dramsi *et al.* 1993) sowie einer Metalloprotease (*mpl*), die vermutlich an der Prozessierung der Lecithinase beteiligt ist (Marquis *et al.* 1997).

Das *inlAB*-Operon liegt nicht im Virulenzgencluster, wird jedoch ebenfalls von PrfA beeinflusst (Dramsi *et al.* 1993). Die PrfA-Expression selbst ist temperaturabhängig. Sie setzt bei 30°C ein und ist bei 37-42°C maximal (Leimeister-Wächter *et al.* 1992), wodurch gewährleistet ist, daß die Virulenzfaktoren erst innerhalb des Wirtsorganismus exprimiert werden.

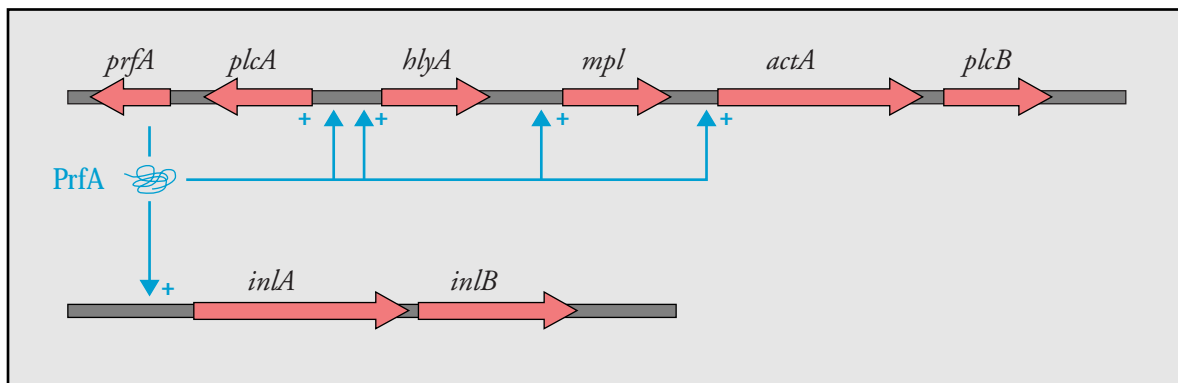


Abb.2: Das Virulenzgencluster (oben) und das Internalin AB-Operon (unten) von *Listeria monocytogenes*.

### 1.3 Listerien als Modellsystem für die Aktin-vermittelte Bewegung bei Eukaryonten

Neben der Befreiung aus dem Phagolysosom mit Hilfe des Listeriolysins ist die intra- und interzelluläre Verbreitung der Listerien ein entscheidender Virulenzfaktor. Um sich innerhalb der infizierten Zelle fortzubewegen benutzt *Listeria monocytogenes* deren Mikrofilamentsystem.

Das Mikrofilamentsystem bildet gemeinsam mit den Mikrotubuli und dem Intermediärfilamentsystem das Zytoskelett eukaryontischer Zellen. Während die Mikrotubuli u.a. für Transportvorgänge innerhalb der Zelle verantwortlich sind, geben die Intermediärfilamente der Zelle und ganzen Geweben mechanische Festigkeit.

Das Mikrofilamentsystem gibt der Zelle ihre äußere Form, und ist als dynamisches System für die Gestaltänderung und die Fortbewegung der Zelle verantwortlich (Alberts 1991). Der Hauptbestandteil des Mikrofilamentsystems ist Aktin. Es liegt entweder als monomeres G-Aktin (globulär), überwiegend an Profilin und Thymosin $\beta$ 4 gebunden, oder als polymeres F-Aktin (filamentös) vor (Pantaloni & Carlier 1993; Sohn & Goldschmidt-Clermont 1994). F-Aktin entsteht durch die Polymerisierung von Aktin-Monomeren. Die notwendigen Reaktionsschritte »Nukleation und Elongation« wurden *in vitro* eingehend untersucht.

Als Nukleation bezeichnet man die Formierung eines thermodynamisch sehr instabilen Aktin-Dimers und daraus eines etwas stabileren Aktin-Trimers, welches als Nukleus für die Polymerisierung zu einem Aktinfilament dient (Wegner 1975). Aus diesem Trimer entwickelt sich durch weitere Anlagerung von Aktin-Monomeren (Elongation) das Mikrofilament. Das Filamentwachstum ist vom Überschreiten einer kritischen Konzentration  $C_{krit}$  an G-Aktin abhängig. Die zwei Enden des Filaments sind dabei durchaus biochemisch verschieden (Pollard & Mooseker 1981). Das (+)-Ende (»barbed end«) hat eine hohe Affinität zu G-Aktin ( $C_{krit}=0,1\mu M$ ). Hier findet in der Zelle das Filamentwachstum statt. Da das (-)-Ende (»pointed end«) eine niedrigere Affinität zu G-Aktin hat ( $C_{krit}=0,8\mu M$ ), wird die kritische Konzentration zur Verlängerung des Filaments nicht erreicht, und deshalb findet am (-)-Ende vorwiegend ein Abbau des Mikrofilamentes statt.

## Einleitung

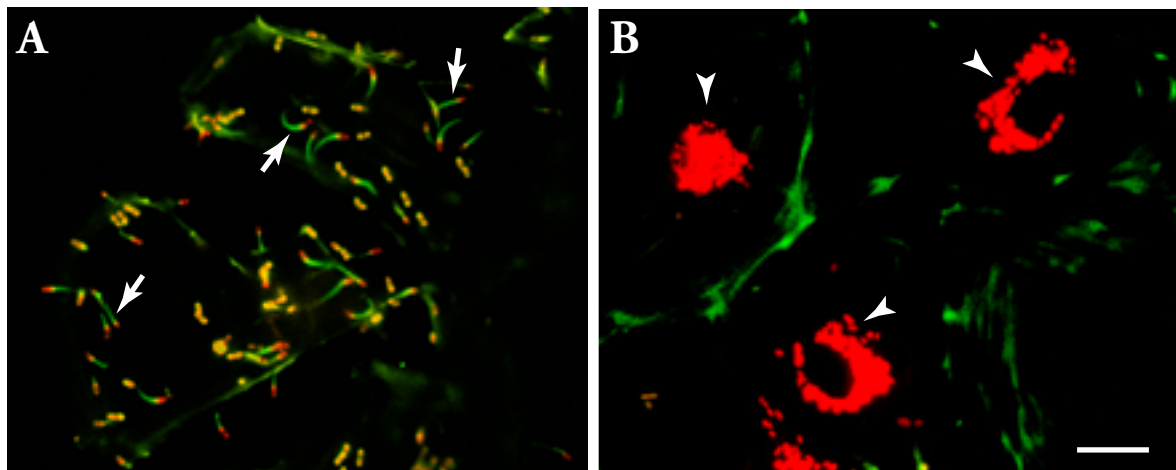
---

In der eukaryontischen Zelle werden Polymerisierung und Abbau der Aktinfilamente durch eine Vielzahl regulatorischer Proteine gesteuert, welche somit die Gestalt und Bewegung der Zelle beeinflussen (Pollard *et al.* 1990; Sun *et al.* 1995).

In diese komplexen Mechanismen greifen die Listerien ein, und nutzen die Polymerisierung von Aktinfilamenten, um sich innerhalb der infizierten Zelle fortzubewegen. In elektronenmikroskopischen Studien wurde beschrieben, daß die schnell wachsenden (+)-Enden der Filamente im Aktinschweif zur Bakterienoberfläche gerichtet sind (Tilney *et al.* 1992ab; Sechi *et al.* 1997). Ferner konnte mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Aktin gezeigt werden, daß Aktin-Monomere nur direkt an der Bakterienoberfläche in die Filamente eingebaut werden (Sanger *et al.* 1992; Theriot *et al.* 1992). Der Aktinschweif verbleibt stationär im Zytoplasma und wird mit einer Halbwertszeit von ca. 1 Minute abgebaut (Theriot *et al.* 1992).

### 1.4 ActA akkumuliert Aktin an der Oberfläche von *Listeria monocytogenes*

Mit dem Aktin-Nukleationsfaktor ActA konnte das Listerienprotein identifiziert werden, das für diese Aktin-vermittelte Fortbewegung verantwortlich ist (Domann *et al.* 1992; Kocks *et al.* 1992; Vazquez-Boland *et al.* 1992). Die Inaktivierung des *actA*-Gens in *Listeria monocytogenes* hatte zur Folge, daß sich Listerien zwar noch in der Wirtszelle vermehren konnten, aber nicht mehr in der Lage waren, mit dem Aktinsystem zu interagieren. Da deshalb keine Ausbreitung von Zelle zu Zelle mehr möglich war, führte dies zur Bildung von Mikrokolonien von Listerien in den infizierten Zellen (Abb.3).

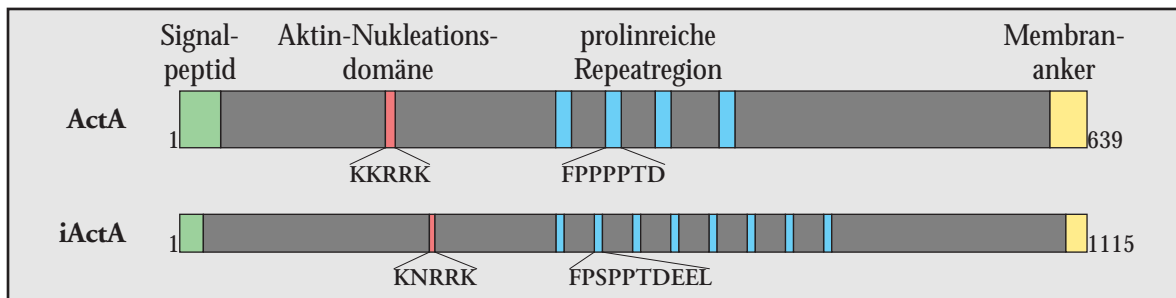


**Abb.3:** PtK<sub>2</sub>-Zellen nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*.

Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die Listerien mit Antikörpern (rot) und die Aktinfilamente mit Phalloidin (grün) angefärbt. Bei wild-typ Bakterien (A) sind deutlich die Aktinschweife (Pfeile) zu erkennen. Isogene  $\Delta actA$ -Mutanten, bei denen das *actA*-Gen inaktiviert wurde (B), wachsen als Mikrokolonien (Pfeilspitzen), da sie kein Aktin akkumulieren können und sich nicht mehr in der Zelle ausbreiten. (Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m)

## Einleitung

Die Sequenzierung des *actA*-Gens aus *Listeria monocytogenes* EGD ergab für das daraus abgeleitete Protein eine Größe von 639 Aminosäuren und ein errechnetes Molekulargewicht von 70 kDa. Im SDS-Gel läuft ActA wie ein 90 kDa Protein. Die aus dem Gen abgeleitete Primärstruktur zeigt einige auffällige Sequenzen (Abb.4).



**Abb.4:** Schematische Darstellung der Primärstrukturen von ActA und iActA. Die konservierten funktionellen Bereiche sind farbig hervorgehoben und charakteristische Aminosäure-Sequenzen wurden angegeben.

Am N-Terminus befindet sich ein 29 Aminosäuren langes Signalpeptid, welches das Protein nach der Translation an die Bakterienoberfläche dirigiert und beim reifen Protein abgespalten ist. Das Carboxyl-Ende bildet ein 26 Aminosäuren langer Membrananker, der das ActA in der Bakterienmembran verankert. Im zentralen Bereich der Primärstruktur liegen vier sich wiederholende prolinreiche Repeatsequenzen.

Eine Reihe von Untersuchungen ergab, daß ActA allein als listeriell Protein für die Akkumulation von Aktin an der Bakterienoberfläche ausreichend ist. Versuche, ActA-Fusionsproteine an die Oberfläche von Pneumokokken zu binden, zeigten, daß ActA für die Akkumulation von Aktin in Zellextrakten ausreicht. Die Zellteilung der so beschichteten Pneumokokken führte zu einer polarisierten Verteilung des ActA-Proteins auf der Oberfläche, so daß diese Bakterien in den *Xenopus*-Extrakten Aktinschweife induzierten und sich fortbewegten (Smith *et al.* 1995).

Die heterologe Expression von ActA in eukaryontischen Zellen ergab, daß sein Membrananker das listerielle Protein an die Oberfläche der Mitochondrien dirigiert (Pistor *et al.* 1994). Mit Hilfe dieses »Mitochondrien Targeting Systems« konnte ActA in den eukaryontischen Zellen genau lokalisiert und seine Verteilung mit zellulären Proteinen



## Einleitung

---

verglichen werden. Die Untersuchung verschiedener ActA-Deletionskonstrukte zeigte, daß die Region des ActA-Proteins, die für die Rekrutierung des Aktins verantwortlich war, auf die kurze Aminosäuresequenz von As 128 bis 152 eingegrenzt werden konnte (Pistor *et al.* 1995). Auch Versuche, verschiedene ActA-Konstrukte an die innere Plasmamembran zu binden, sowie Studien an *actA*-Mutanten, die mit unterschiedlichen ActA Deletionskonstrukten komplementiert wurden, bestätigten, daß der aminoterminalen Domäne von ActA die F-Aktin rekrutierende Rolle zukommt (Friederich *et al.* 1995). Die zentrale prolinreiche Repeatregion schien dabei eine verstärkende Funktion für die effektive Aktin-Polymerisierung an den Listerien zu übernehmen (Lasa *et al.* 1995).

Die zweite pathogene Art *Listeria ivanovii* zeigte in Gewebekulturzellen den gleichen charakteristischen Infektionszyklus wie *L.monocytogenes* (Karunsagar *et al.* 1993). Die Identifizierung des Aktin Nukleationsfaktors iActA (Kreft *et al.* 1995; Gouin *et al.* 1995) ergab, daß trotz nur geringer Homologie zwischen ActA und iActA die funktionellen Domänen konserviert sind (Gröbe 1995; Gerstel *et al.* 1996).

Obwohl die Aminosäuresequenz von ActA keine Homologien zu bisher bekannten Proteinen höherer Zellen aufweist, findet man Variationen seiner prolinreichen Sequenzen in den Zytoskelettproteinen Vinculin und Zyxin wieder, die in den fokalen Adhäsionsplaques lokalisiert und an der Interaktion zwischen Aktinfilamenten und der Plasmamembran beteiligt sind (Price *et al.* 1989; Sadler *et al.* 1992; Macalima *et al.* 1996).

Vinculin verfügt außerdem über ein durch intramolekulare Faltung verborgenes Aktinbindungsmotif, das durch Auffaltung freigelegt wird (Westmeyer *et al.* 1990; Johnson & Craig 1995).

Eine direkte Interaktion von ActA und Aktin konnte jedoch bis heute nicht nachgewiesen werden (Tilney *et al.* 1990 und 1992), so daß vermutlich andere zelluläre Proteine die notwendige Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellen müssen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde eine Vielzahl von Wirtszellproteinen im listeriellen Aktinschweif identifiziert. Zu diesen gehören  $\alpha$ -Actinin, Filamin, Fimbrin, Villin, Ezrin, Radixin, VASP und der Arp2/3-Komplex (Dabiri *et al.* 1990; Kocks & Cossart 1993; Dold *et al.* 1994; Temm-Grove *et al.* 1994; Chakraborty *et al.* 1995; Welch *et al.* 1996). Die meisten dieser Proteine können Aktinfilamente quervernetzen und tragen so zur Stabilisierung des Aktinschweifes bei.

### 1.5 VASP und Mena sind Liganden von ActA

Besonders auffällig war die Verteilung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP). VASP war überwiegend am Ansatz des Aktinschweifes an dem Bakterienpol lokalisiert (Chakraborty *et al.* 1995).

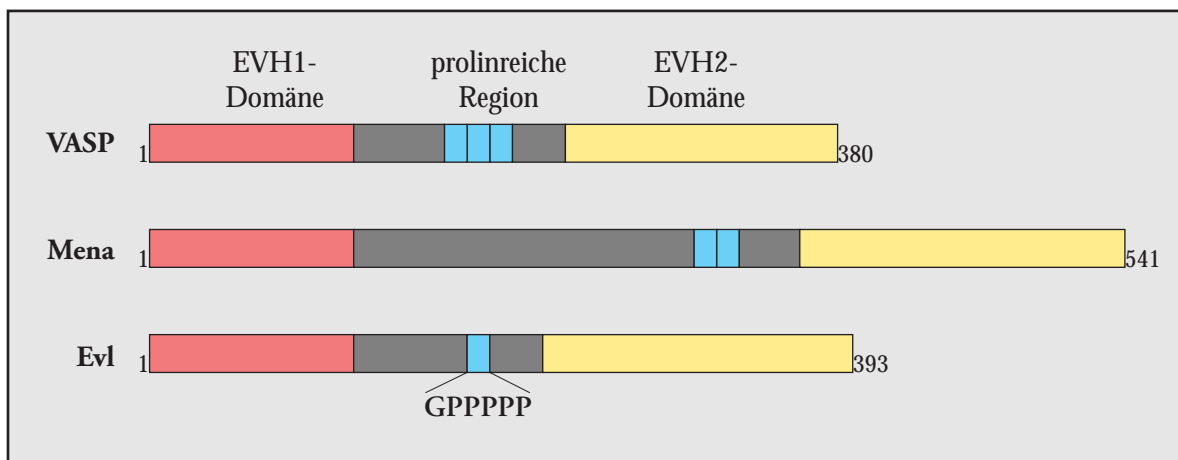
VASP wurde ursprünglich als ein *in vivo* Substrat für cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen in human Thrombozyten identifiziert (Halbrügge & Walter 1989; Haffner *et al.* 1995). Es konnte in den verschiedensten Zelllinien nachgewiesen werden, in denen es mit Aktin-Stressfasern und besonders den fokalen Adhäsionsplaques assoziiert war (Reinhard *et al.* 1992). Diese sind die Kontaktstellen zwischen Endbereichen der Stressfasern und der extrazellulären Matrix. Sie bestehen aus Aggregaten von transmembranen Integrinen sowie einer Vielzahl von cytoplasmatischen Proteinen (Übersicht bei: Gumbiner 1993; Jockusch *et al.* 1995). Hier ist VASP wahrscheinlich an der Mikrofilamentorganisation und an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt.

VASP war schließlich das erste Protein, für das eine direkte Bindung an ActA nachgewiesen werden konnte (Chakraborty *et al.* 1995) und damit als lange gesuchter zellulärer Faktor identifiziert, der eine Verbindung zwischen den intrazellulären Listerien und dem Mikrofilamentsystem der Wirtszelle herstellt.

Mit dem etablierten Mitochondrien Targeting System konnte die prolinreiche Repeatregion von ActA als die VASP-Bindungsdomäne eingegrenzt werden. Ohne VASP findet die Aktin-Akkumulation deutlich langsamer statt (Pistor *et al.* 1995; Niebuhr *et al.* 1997). Über die Bindung von Profilin (Reinhard *et al.* 1995a) könnte VASP die lokale Profilaktin-Konzentration erhöhen, und dadurch die Effizienz der Aktin-Polymerisierung steigern. Sequenzvergleiche identifizierten zwei weitere Zytoskelettproteine mit hohen Homologien zu VASP: Mena und Evl (Gertler *et al.* 1996). Mena ist das Säugerhomolog zu Ena, welches ursprünglich als ein Protein in *Drosophila* entdeckt wurde, das Mutationen in der Abelson-Tyrosin-Kinase (Abl) supprimieren kann (Gertler *et al.* 1995). Ena-Mutationen in *Drosophila* führen zu einem rezessiv letalen Phänotyp aufgrund von Defekten während der Ausbildung des embryonalen Nervensystems. Über Evl (Ena-VASP like) ist außer seiner Homologie zu VASP und Mena nichts weiter bekannt.

## Einleitung

Die Primärstrukturen dieser drei Proteine weisen eine einheitliche Domänenstruktur auf, die aus einer zentralen prolinreichen Region und zwei flankierenden, hochkonservierten Domänen, den Ena-VASP Homologiedomänen (EVH1 und EVH2), besteht (Abb.5). Ein Hexapeptid aus den Aminosäuren GPPPPP ist in VASP dreimal, in Mena zweimal und in Evl einmal vorhanden. Bisher konnte auch für Mena eine Interaktion mit ActA und Profilin nachgewiesen werden (Gertler *et al.* 1996; Niebuhr *et al.* 1997), was auf eine ähnliche Funktion hinweist.



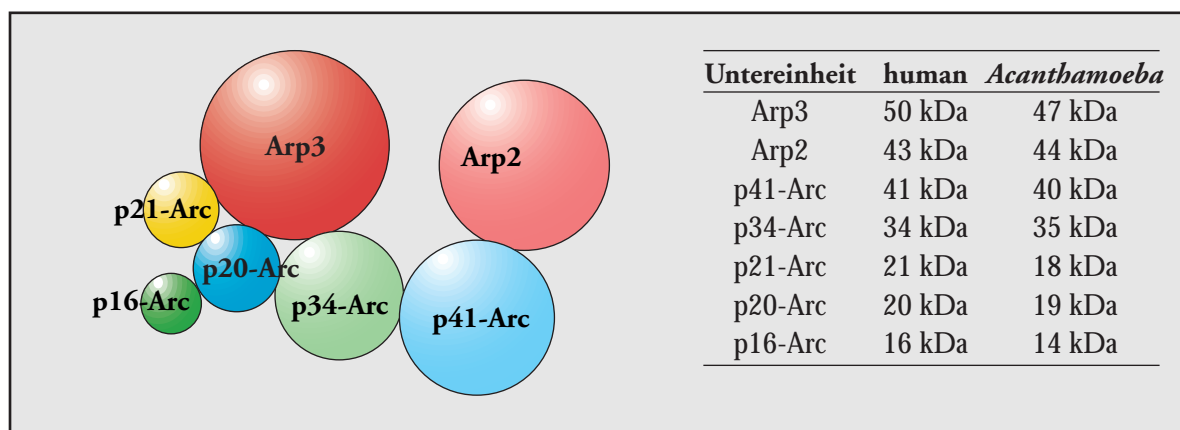
**Abb.5:** Schematische Darstellung der Primärstrukturen von VASP, Mena und Evl. Die homologen Domänen sind farbig hervorgehoben.

## 1.6 Der Arp2/3-Komplex initialisiert die Aktin-Akkumulation an Listerien

Durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Profilin wurde aus *Acanthamoeba* ein Proteinkomplex gereinigt (Machesky *et al.* 1994), in dem zwei Proteine identifiziert wurden, die Homologie zu den Aktin-ähnlichen Proteinen Arp2 und Arp3 («Actin related protein») besitzen. Die Arps sind Proteine mit 30-60% Homologie zu Aktin (Tanaka *et al.* 1992; Michaille *et al.* 1995; Frankel & Mooseker 1996).

Neben Arp2 und Arp3 gehören zu dem Arp2/3-Komplex aus *Acanthamoeba* noch Untereinheiten von 40, 35, 19, 18 und 14 kDa Größe. Außerdem wurden in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* Homologe des Arp2/3-Komplexes identifiziert (Moreau *et al.* 1996; McCollum *et al.* 1996). Antikörper gegen Arp2 und Arp3 zeigten eine Lokalisierung des Komplexes in der aktinreichen Peripherie der Amöben (Machesky *et al.* 1994; Kelleher *et al.* 1995), sowie in aktinreichen Flecken («actin patches») bzw. Aktinfasern («actin cables») von *S.cerevisiae* und *S.pombe* (Moreau *et al.* 1996; McCollum *et al.* 1996).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß sich der Arp2/3-Komplex *in vitro* seitlich an Aktinfilamente anlagert, und zur Quervernetzung und Bündelung von F-Aktin führen kann (Mullins *et al.* 1997). Mit Hilfe des chemischen Crosslinking konnte geklärt werden, wie die Untereinheiten miteinander verbunden sind (Abb.6).



**Abb.6:** Schematische Darstellung des humanen Arp2/3-Komplexes.

Die Abbildung veranschaulicht, welche Untereinheiten miteinander interagierten.

In der Tabelle sind die Molekulargewichte der humanen und der *Acanthamoeba* Untereinheiten gegenübergestellt. (nach Mullins *et al.* 1997)

## Einleitung

---

Aus Thrombozytenextrakten, in denen sich Listerien fortbewegten, konnte der humane Arp2/3-Komplex gereinigt werden. Dieser besteht aus sieben Untereinheiten von 47 (Arp3), 44 (Arp2), 41, 34, 21, 20 und 16 kDa Größe. Peptidantikörper gegen Arp3 zeigten, daß der Arp2/3-Komplex nicht nur auf der Oberfläche intrazellulärer Listerien lokalisiert ist, sondern sich auch über den gesamten Aktinschweif verteilt (Welch *et al.* 1997a).

### 1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die bisherigen Ausführungen zeigten, daß Listerien wichtige Mechanismen der Wirtszelle zu ihrem eigenen Vorteil ausnutzen. Die Polymerisierung von Aktinfilamenten auf der Bakterienoberfläche entspricht dabei wahrscheinlich Vorgängen an der Innenseite der Plasmamembran in der Führungslamelle motiler Zellen. Doch trotz zahlreicher Untersuchungen sind die Mechanismen, die zur Neubildung von Aktinfilamenten führen, noch kaum verstanden. Mit *Listeria monocytogenes* als Modellsystem lassen sich daher nicht nur die Pathogenitätsmechanismen intrazellulärer Krankheitserreger untersuchen, sondern darüber hinaus grundsätzliche Erkenntnisse über die Regulation der Mikrofilamentdynamik gewinnen.

Zu Beginn dieser Arbeit war mit VASP zwar der erste Ligand des listeriellen ActA-Proteins gefunden, doch war dessen Rolle in der Maschinerie der Aktin-Akkumulation noch unklar. Mit Hilfe biochemischer Modifikation von *Listeria-in-vitro*-Motilitätssystemen sollte der Einfluß von VASP näher untersucht werden.

Mit dem Arp2/3-Komplex konnte ein Schlüsselement der Aktin-Rekrutierung identifiziert werden. Für weitergehende Fragestellungen war es von großem Interesse, Antikörper gegen die Untereinheiten des Komplexes herzustellen und zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte das ActA-Protein weiter charakterisiert werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf einer Mutationsanalyse der N-terminalen Domäne, um die funktionellen Bereiche eingrenzen zu können.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Chemikalien, Antikörper und Oligonukleotide**

#### **2.1.1 Chemikalien**

Alle verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kulturmedien wurden von den Firmen Applied Biosystems, Biorad, Baker, Bayer, Boehringer Mannheim, Dianova, Difco, Fluka, Gibco BRL, Hoechst, Merck, MoBiTec, Molecular Probes, Perkin Elmer, Amersham Pharmacia Biotech, Promega, Qiagen, Riedel-de-Haen, Roth, Serva und Sigma bezogen.

Sie haben, sofern nicht anders angegeben, die Reinheitsgrade »p.a.«, »reinst« bzw. »für mikrobielle Medien«.

Restriktionsendonukleasen stammten von den Firmen Gibco BRL, New England Biolabs und Boehringer Mannheim.

Alle wäßrigen Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt, welches mit einer MilliQ/UF-Ultrafiltrationsanlage (Millipore) aufbereitet wurde. Sterilisiert wurde durch autoklavieren bzw. sterilfiltrieren.

### 2.1.2 Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper wurden zur Verfügung gestellt von:

- |   |                               |
|---|-------------------------------|
| - anti ActA (polyklonal)                                | Dr. K. Niebuhr-Ebel, GBF      |
| - anti VASP M4 (polyklonal)                             | Dr. M. Reinhard, Uni Würzburg |
| - anti VASP #159, #226,<br>#245, #310, #341(monoklonal) | Dr. K. Abel, Uni Würzburg     |
| - anti Mena C49 (monoklonal)                            | Dr. F. Gertler, MIT Boston    |
| - anti $\alpha$ -Actinin (monoklonal)                   | Sigma                         |

### 2.1.3 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper für Western-Blots und ELISA (Peroxidase-konjugiert) bzw. Immunfluoreszenzmikroskopie (Rhodamin- bzw. FITC-konjugiert) wurden von Dianova bezogen.

- Peroxidase-konjugiert Ziege anti Kaninchen IgG (H+L)
- Peroxidase-konjugiert Ziege anti Maus IgG + IgM (H+L)
- Rhodamin-konjugiert Ziege anti Kaninchen IgG (H+L)
- Rhodamin-konjugiert Ziege anti Maus IgG + IgM (H+L)
- FITC-konjugiert Ziege anti Kaninchen IgG (H+L)
- FITC-konjugiert Ziege anti Maus IgG + IgM (H+L)

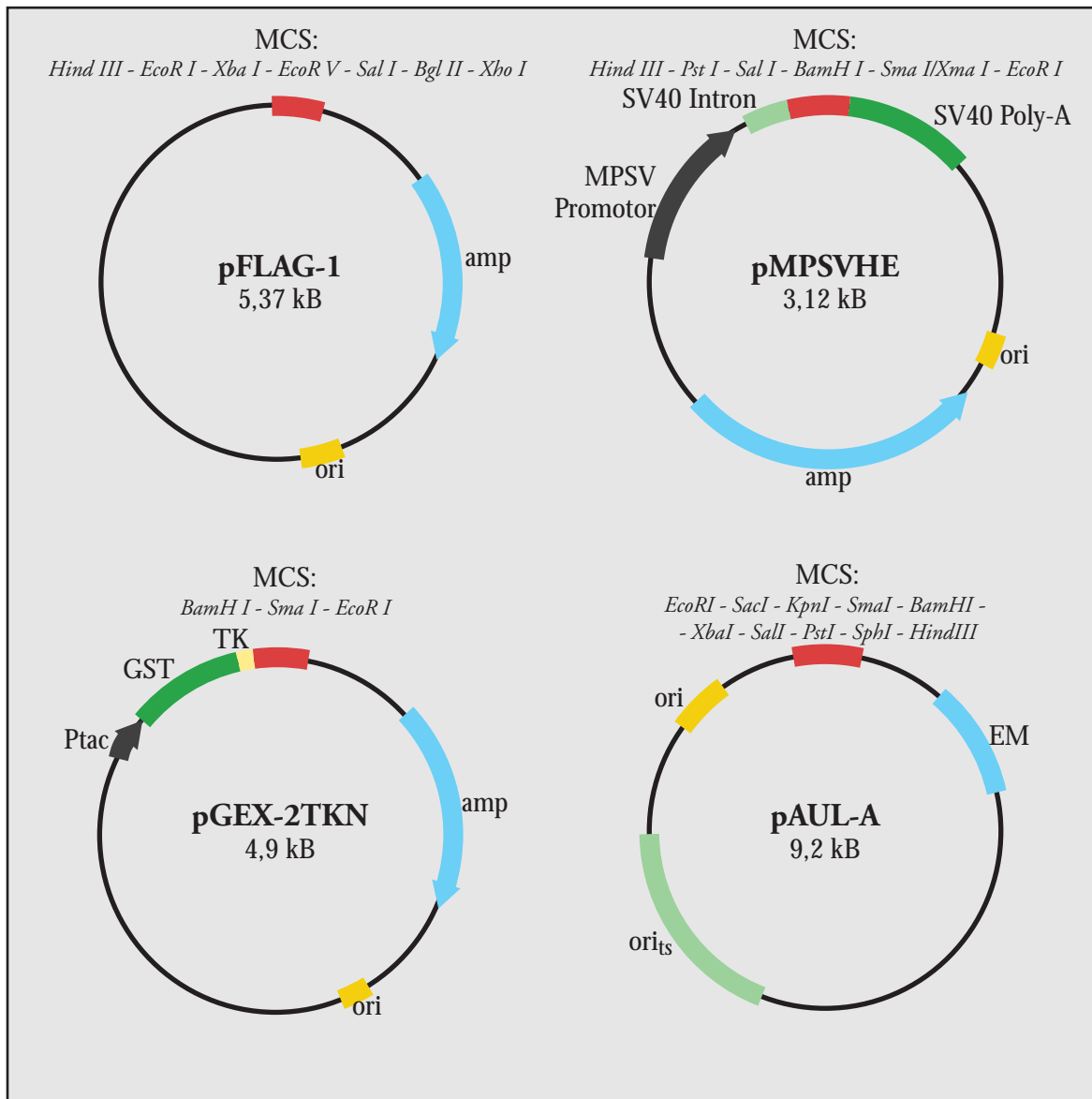
### 2.1.4 Reagenzien für die Fluoreszenzmikroskopie

- Rhodamin-konjugiertes Phalloidin; Sigma
- FITC-konjugiertes Phalloidin; Sigma
- MITOTRACKER (Vitalfarbstoff markiert selektiv Mitochondrien); Molecular Probes

## Material und Methoden

### 2.1.5 Plasmide

- pFLAG-1; International Biotechnologies, Inc.
- pMPSVHE; GBF-Arbeitsgruppe Dr. Hauser (Artelt *et al.* 1988)
- pGEX2TKN; Amersham Pharmacia Biotech (modifiziert)
- pAUL-A; Arbeitsgruppe Dr. Chakraborty, Uni Gießen (Schäferkordt & Chakraborty 1995)



**Abb.7:** Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide.

MCS= multiple cloning site; amp= Ampicillin Resistenz-Gen; ori= origin of replication; GST= Glutathion-S-Transferase; TK= Thrombin-Protease Erkennungssequenz; Ptac= tac-Promotor; EM= Erythromycin Resistenz-Gen; ori<sub>ts</sub>= origin of replication in gram(+)-Bakterien



## Material und Methoden

### 2.1.6 Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide wurden entweder mit dem »Applied Biosystems« Synthesizer in der GBF-Arbeitsgruppe von Dr. McCarthy hergestellt, oder von GIBCO BRL bezogen.

**Tab.1:** Liste der verwendeten Oligonukleotide.

Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

Oligo-Name	5'-3'-Sequenz
M100	GTAAAACGACGGCCAGT
M101	CAGGAAACAGCTATGAC
arp3-5'-313	GAACCTGAAGACCATTATT
arp3-5'-574	CAATGTTCCAGG
arp3-5'-1075	TGAAGTAATTCAG
arp3-3'-528	GTATTCAATGGAGG
arp3-3'-1034	CAAACCTCTGGATG
arp3-5'-Hind/Nco	AGCAGGCAAGCTTGACCATGGCGGGACGG
arp3-3'-Bam	CAATAACTATGGATCCAAATTTTACGCATGAC
arp2-5'-340	GGGACTACACATTCGGGCC
arp2-5'-578	GTGTCACTCACATTTGCCC
arp2-5'-1008	GGCCTGCCATCGAGGTTGG
arp2-3'-369	TGAGCTTCTCTGG
arp2-3'-690	GGTTGAAGGCATATCCTCGC
arp2-3'-1009	CCAGGATACATGGTAGAACC
arp2-5'-Hind/Nco	TCACCAAGCTTGACCATGGACAGCCAGGGC
arp2-3'-Bam	CAAGCCTGGGATCCTATCGAACAGTCACACC
p41-5'-501	ATCCGCTCCACCG
p41-5'-1041	GAAGGCGAGCTCC
p41-3'-298	TCTGTGCCGCAGG
p41-3'-800	CAGAGTCGCGACG
p41-5'-Hind/Nco	CTCAGAAGCTTAGCCGCCATGGCCTACC
p41-3'-Bam	GGATGAAGGCAACAGGATCCTCACAGGTC
p34-5'-505	AGGGCAGTTATCC
p34-3'-586	CTGTGCTGAAGAC
p34-5'-Hind/Nco	TGGGGGCAAGCTTCGCCATGGTCCTGCTGG
p34-3'-Bam	CCGCTTCCTCCTCTGGATCCCAAGATTAGC
p21-5'-308	TGTATACGCTGGG
p21-3'-170	GTAATAGATGGC
p21-5'-Hind/Nco	GGCCCAAGCTTCGCCACCATGGCGGCTTAC
p21-3'-Bam	GCTGCCCCGGGATCCCTTCACTGTC

## Material und Methoden

**Tab.1 (Fortsetzung):** Liste der verwendeten Oligonukleotide.

Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

Oligo-Name	5'-3'-Sequenz
actAP2X	TGAAGCTCGAGAAGCAGTTGGGGT
actA5Hi2	GACATAAAGCTTGCAATGACAGATAGCG
actA5Sa1	CTAGCATGCAGTCGACAGATGAGTCTTC
actA5Sa2	CTGAAGTAAAGTCGACGATTGTTGATAA
actA3Bg15	CGAAGATCTTATGGCTATCCTTCTTTTATAATTTCCG
actA3Bg16	CGAAGATCTTATGGCTATCCTTCTTATTATAATTTCCG
actA3Bg17	CGAAGATCTTATGGCTATGCTACTTATTATAATTTCCG
actA3Bg18	CGAAGATCTTATGGCTTTCTTTCTTTTATAATTTCCG
actA3Sa1	TTACTTTTGTGTTGTTTATCCGTCGACGTAAGGC
actA3Ba	TTTGAATTTTCGGATCCTTCACCTCACTTTT
actA3Ba6	CCTCACTTTTCTTTGGATCCGTGTTTTTAA
actA5-S155A	GCCATAGCATCAGCGGATAGTGAGCTTG
actA5-S155E	GCCATAGCATCAGAGGATAGTGAGCTTG
actA5-S155D	GCCATAGCATCAGACGATAGTGAGCTTG
actA3-S155A	CAAGCTCACTATCCGCTGATGCTATGGC
actA3-S155E	CAAGCTCACTATCCTCTGATGCTATGGC
actA3-S166D	CAAGCTCACTATCGTCTGATGCTATGGC
PGEX-5'-SQ	GCCTTTGCAGGGCTGGCAAG
PGEX-3'-SQ	GAGCTGCATGTGTCAGAGGTTT
actA5-SQ1	TGAGAAATACGAACAAAGCAGACC
actA5-SQ2	ATCATCGGATAGTGAGCTTGA
actA5-SQ3	CCTGAAGTAAAGAAAGCGATTG
actA5-SQ4	ATGCTCCTGCTACATCGGAACCG
actA5-SQ5	GAATCCATCACAGCCATTAAATG
actA5-SQ6	AAAAAGAAGCTACAGAGAGCG
actA5-SQ7	ATCCGGGAAACAGCATCCTCGCTA
actA5-SQ8	AAAAGTGCAGGGTTAATTGACC
actA5-SQ9	GGTTGTATTAGCGTATCACGAG
actA5-SQ10	CGGATAGCGCAGCGGAAATTAA
actA5-SQ19	GATAGCGCAGCGGAAATTAAAAAAGAAGGAAA
actA5-SQ20	AACAGGGCTACTAATAAATGGATTTAATGGTAAAAA
actA5-SQ21	GTATCTTGGTCCCGTATTTACCTCGCTTGG
actA3-SQ11	TTCTTTCTTCAATGCCAGCAG
actA3-SQ12	AGGAAGTGCTGCTAGCTTTGG
actA3-SQ13	AAAAACCCGCATTTCTTGAGTGT
actA3-SQ14	AATAGCACTTCTCAAAGTAGCTAAAT
actA3-SQ15	GGTCAATTAACCCCTGCACTTTT
actA3-SQ16	GGCTTTCAAGCTCACTATCCGA
actA3-SQ17	TTGCTATTAGGTCTGCTTTGTTTCG
actA3-SQ18	CTCGTGATACGCTAATAACAACC

### 2.2 Bakterienkulturen

#### 2.2.1 *Escherichia coli*-Kulturen

Stämme:

*E. coli* TG2

Genotyp: *supE*, *hsd* $\Delta$ 5, *thi*,  $\Delta$ (*lac-proAB*),  $\Delta$ (*srl-recA*)306::*Tn10(tet<sup>r</sup>)*/F'  
(*traD36 proAB<sup>+</sup>*, *lacI lacZ*  $\Delta$ M15)

*E. coli* BL21(DE3)

Genotyp: *E. coli* B, F<sup>-</sup>, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(*r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>), *gal*, *l*(DE3)

Medium:

LB-Medium:	Bacto-Trypton	10	g/l
(Luria-Bertani broth)	Bacto-Hefeextrakt	5	g/l
	NaCl	120	mM

Für Agarplatten wurden 16 g/l Bacto-Agar zugesetzt. Als Selektionsmedien mit Antibiotika wurden verwendet:

LB<sup>amp</sup>: LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

LB<sup>KM</sup>: LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin

Kulturbedingungen:

Flüssigkulturen wurden in LB-Medium angeimpft und in Reagenzgläsern und Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator bei 37°C und 150 Upm kultiviert. Übernachtkulturen wurden als 1000-5000-fache Verdünnungen stationärer Vorkulturen angesetzt. Stammkulturen wurden auf LB-Agar ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und bei 4°C gelagert.

### 2.2.2 *Listeria*-Kulturen

#### Stämme:

*Listeria monocytogenes* EGD Serotyp 1/2a

*Listeria monocytogenes* LUT12 (pActA3)

*Listeria monocytogenes* EGD  $\Delta actA3$  (zur Verfügung gestellt von Dr. T. Chakraborty)

*Listeria monocytogenes* EGD  $\Delta actA5$  (zur Verfügung gestellt von Dr. T. Chakraborty)

Der Stamm *Listeria monocytogenes* EGD ist wild-typ und wurde aus der Listerien-Referenzstammsammlung von Prof. Hof, Universität Heidelberg bezogen. Der Stamm LUT12 (pActA3) ist ein *L.monocytogenes* LO28-Derivat (Kocks *et al.* 1992). Die Stämme  $\Delta actA3$  und  $\Delta actA5$  sind isogene *actA*-Mutanten mit Deletionen der As 128-152 bzw. As 241-423.

#### Medien:

BHI-Medium:                      BHI (Gibco BRL)                      37 g/l  
(Brain-Heart-Infusion broth)

Als Selektionsmedium mit Antibiotika wurde verwendet:

BHI<sup>CE</sup>: BHI-Medium mit 7 µg/ml Chloramphenicol und 5 µg/ml Erythromycin

BHI-Medium wurde als fünffach konzentrierte Lösung angesetzt und in einer Minitan Ultrafiltrationsanlage (Millipore) mit einem Ausschlußvolumen von 10 kDa filtriert. Das Filtrat wurde dann mit H<sub>2</sub>O auf einfache Konzentration verdünnt und autoklaviert. Für Agarplatten wurden 16 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

#### Kulturbedingungen:

Zur langfristigen Lagerung wurde der Stamm bei -70°C in BHI-Medium, dem 30% (v/v) Glyzerin zugesetzt wurde, gelagert. Aus diesen »Glyzerin-Stocks« wurden Übernachtskulturen angesetzt, auf BHI-Agar ausgestrichen und für max. 4 Wochen bei 4°C gelagert. Flüssigkulturen wurden in Reagenzgläsern und Erlenmeyerkolben bei 37°C und 150 Upm kultiviert.

### 2.3 Zellkultur

#### 2.3.1 Zelllinien und Kulturbedingungen

##### Zelllinien:

PtK <sub>2</sub> (ATCC CCL 56):	Nierenepithelzelllinie aus der Känguruh-Beutelratte <i>Potourus tridactylis</i>
HELA-S3 (DSMZ ACC161):	Humane Gebärmutterhals-Krebszelllinie
AG8 (ATCC CRL 1580):	Murine Myelomzelllinie P3X63Ag8.653

##### Medium:

Minimal Essential Medium mit Earle's Salzen (»MEM«; Gibco BRL)  
+ 10% (v/v) fötales Kälberserum (»fetal calf serum: FCS«; Gibco BRL)  
+ 2 mM L-Glutamin (Flow Laboratories)  
+ nicht-essentielle Aminosäuren (100-fach konz. sterile Lösung, Flow Laboratories)

##### Kulturbedingungen:

Die Zellen wurden in Gewebekulturschalen (ø 10 cm) »Nunclon Delta« (Nunc) mit 15 ml Zellkulturmedium im Inkubator (Forma Scientific) bei 37°C und 8% (v/v) CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert.

Die adhärent wachsenden Zellen wurden alle 2-4 Tage passagiert. Dazu wurde die Kultur einmal mit sterilem PBS gespült und anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung in Puck's Saline (0,5 mg/ml Trypsin, 0,2 mg/ml EDTA; Gibco BRL) für 3 Min. inkubiert. Durch vorsichtiges Spülen mit einer Pipette wurden die Zellen von dem Kulturschalenboden abgelöst, mit Medium verdünnt und in neue Gewebekulturschalen überführt.

##### Einfrieren und Auftauen:

Zum Einfrieren wurden die Zellen in Medium suspendiert, in sterile Zentrifugenröhrchen (Nunc) überführt und 5 Min. bei 900 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskaltem FCS mit 8% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert, die Zellsuspension in

## Material und Methoden

---

Kryoröhrchen aliquotiert (0,5 ml) und im Einfrierautomaten (Cryoson) innerhalb einer Stunde von 4°C auf -120°C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen im 37°C Wasserbad erwärmt und in vorgewärmtes Kulturmedium überführt.

### 2.3.2 Transfektion von Zellkulturen

(nach Graham & van-der Eb 1973)

#### Vorbereitung der Zellen:

Eine 24-Well Platte (Nunc) wurde mit sterilen Deckgläschen (ø 10 mm) bestückt. Jedes Well wurde mit einer frisch trypsinierten Zellsuspension beimpft und inkubiert, bis sich ein semikonfluent (ca. 75% Flächenbedeckung) Zellrasen entwickelt hat. Am Tag der Transfektion wurde das Kulturmedium erneuert.

#### Lösungen:

2x HEBS:	NaCl	280	mM
(Hepes buffered saline)	Hepes-Säure	46	mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5	mM
		pH 7,05	

Der pH-Wert des HEBS-Puffers muß möglichst genau eingestellt werden, da schon geringe Abweichungen die Effektivität der Transfektion verringern.

CaCl <sub>2</sub> -Lösung:	CaCl <sub>2</sub>	2,5	M
----------------------------	-------------------	-----	---

Beide Lösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

## Material und Methoden

---

### Herstellung der $\text{CaCl}_2$ -Präzipitate:

Um DNA in eukaryontische Zellen transfizieren zu können, muß sie vorher in Kalziumchloridkristalle verpackt werden. Diese Kristalle bilden sich im neutralen Milieu durch Präzipitation von Kalziumphosphat, welches aus dem  $\text{CaCl}_2$  und dem Phosphat des HEBS-Puffers entsteht. Durch die Zugabe von chromosomaler DNA der Zelllinie (Carrier-DNA) wurde die Effektivität der Transfektion drastisch erhöht. Der genaue Mechanismus der DNA Aufnahme ist jedoch noch nicht geklärt.

Zur Herstellung der Präzipitate wurde folgender Ansatz pipettiert (für 24 Deckgläschen):

DNA	50	$\mu\text{g}$
Carrier-DNA	50	$\mu\text{g}$
2,5 M $\text{CaCl}_2$	125	$\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}$	ad 1,25	ml

In einem 15ml Röhrchen wurden 1,25 ml 2xHEBS vorgelegt und auf einem Reagenzglasschüttler bei geringer Drehzahl gerührt. Der Reaktionsansatz wurde dann langsam hinzutropft. Zu schnelles Hinzufügen hat größere Präzipitate zur Folge, wodurch die Effektivität der Transfektion verringert wurde! Dieser Ansatz wurde nun für 30-60 Min. bei RT stehen gelassen.

### Transfektion:

Von den vorbereiteten Zellen wurde das Medium abgesaugt und je 100  $\mu\text{l}$  der Präzipitatlösung auf jedes Deckgläschen pipettiert. Nach 10-15 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium zugegeben und die Schale bei 37°C inkubiert. Nach 5-6 h wurde die Transfektion gestoppt, indem die Transfektionslösung gegen frisches Medium ausgetauscht wurde. Anschließend wurde über Nacht inkubiert, um die DNA zu exprimieren.

## Material und Methoden

---

### 2.3.3 Infektion von Zellkulturen mit *Listeria monocytogenes*

#### Lösungen:

PBS:	KCl	26,5	mM
(phosphate buffered saline)	NaCl	137	mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8	mM
		pH 7,4	

#### Fixierlösung:

Para-Formaldehyd 4% (w/v)  
in PBS

#### Infektion:

Die Zellen wurden möglichst 2 Tage vor der Infektion passagiert, so daß sie zum Zeitpunkt der Infektion semikonfluent und in einem guten Zustand sind. Für mikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen auf Deckgläschen (ø 10 mm) ausgesät. Direkt vor Beginn der Infektion wurde das Medium durch serumfreies Kulturmedium ersetzt.

Von dem Listerienstamm wurde eine Übernachtskultur angesetzt. Davon wurde 1 ml abgenommen und die Bakterien wurden durch 2 Min. Zentrifugation bei 4000xg pelletiert. Die Bakterien wurden zweimal mit serumfreiem Zellkulturmedium gewaschen und 1:500 in serumfreiem Zellkulturmedium verdünnt. Von dieser Bakteriensuspension wurden 100 µl in jede Vertiefung einer 24-Well Platte gegeben, die Platte für 5 Min. bei 1000xg im Ausschwenkrotor zentrifugiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension abgezogen und durch 1 ml serumhaltiges Zellkulturmedium mit 25 µg/ml Gentamycin (Flow Laboratories) ersetzt. Gentamycin ist ein Antibiotikum, das extrazelluläre Bakterien abtötet, jedoch nicht von den Gewebekulturzellen aufgenommen wird, so daß bereits intrazelluläre Bakterien nicht geschädigt werden. Nach weiterer Inkubation (in der Regel 3 h) wurde die Infektion abgebrochen, indem das Medium abgezogen wurde, die Deckgläschen einmal mit PBS gewaschen und mit Fixierlösung überschichtet wurden. Darin konnten sie bei 4°C längere Zeit gelagert werden.



### 2.3.4. Fluoreszenzmikroskopie

#### Lösungen:

Die Antikörper wurden in 10% (v/v) FCS in PBS verdünnt.

- pAk anti-ActA	1:100
- pAk anti-VASP M4	1:100
- mAk anti-Mena C49	unverdünnter Hybridomüberstand
- mAk anti- $\alpha$ -Actinin	1:200
- mAk anti-p21-Arc #24A6	1:50
- pAk anti-p21-Arc	1:50
- Rhodamin-konj. Ziege anti-Kaninchen	1:100
- Rhodamin-konj. Ziege anti-Maus	1:100
- FITC-konj. Ziege anti-Kaninchen	1:100
- FITC-konj. Ziege anti-Maus	1:100
- Rhodamin-konj. Phalloidin	1:200

#### Immunfärbung:

Die Gewebekulturzellen wurden auf den Deckgläschen fixiert, in dem sie für 15 Min. mit Fixierlösung inkubiert wurden. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden sie anschließend für 1 Min. mit 0,2% (v/v) Triton X-100 in Fixierlösung behandelt. Alternativ wurden die Zellen mit eiskaltem (-20°C) Methanol in einem Schritt fixiert und permeabilisiert. Nachdem die Fixierlösung abgezogen wurde, wurden die Deckgläschen dreimal in PBS gewaschen.

Die Immunfärbung wurde in einer feuchten Kammer (10x10 cm Petrischale mit wassergetränktem Filterpapier ausgelegt) auf Parafilm durchgeführt. Dazu wurden 5  $\mu$ l Antikörperlösung auf den Parafilm gegeben und das Deckgläschen wurde mit der bewachsenen Seite nach unten aufgelegt. Nach 30 Min. Inkubation bei RT wurden die Deckgläschen dreimal in PBS gewaschen und mit den FITC- bzw. Rhodamin-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert.

## Material und Methoden

---

Für die Färbung der Mitochondrien wurde der Fluoreszenzfarbstoff »Mitotracker« (Molecular Probes) verwendet. Dieser ist ein Vitalfarbstoff, der von intakten Mitochondrien aufgenommen und bei der nachfolgenden Formaldehyd-Fixierung kovalent an Proteine gebunden wird. Von dem gelösten Mitotracker wurden 2 µl/ml (=468 nM) in Zellkulturmedium verdünnt und noch vor der Fixierung auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation für 45-60 Min. bei 37°C wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und es konnte mit Antikörpern die zweite Färbung durchgeführt werden.

Um Aktinfilamente anzufärben wurde direkt FITC-markiertes Phalloidin eingesetzt. Nach dem Färben wurden die Deckgläschen auf Objektträger in »Prolong AntiFade« (Molecular Probes) eingebettet und mit farblosem Nagellack versiegelt. So konnten die Präparate für längere Zeit bei 4°C gelagert werden.

### Auswertung:

Die Präparate wurden schließlich mit einem Fluoreszenzmikroskop (ZEISS AXIOPHOT 2) mit den Epifluoreszenzfiltern für FITC (ZEISS Nr.10) und Rhodamin (ZEISS Nr.15) ausgewertet. Zur Dokumentation war das Mikroskop mit einem Videosystem (gekühlte CCD Kamera, Princeton Instruments) ausgestattet, das über einen Computer durch IPLAB-Software (Scanalytics) gesteuert wurde. Die elektronischen Bilder wurden zur Publikation mit ADOBE PHOTOSHOP bearbeitet.

### 2.4 Molekularbiologische Methoden

#### 2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus Listerien

##### Lösungen:

0,1x SSC:	NaCl	15	mM
	Na <sub>3</sub> -Citrat	1,5	mM

Lösung I:	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	mM
	Saccharose	20	% (w/v)
	Lysozym	0,25	% (w/v)
		pH 7,0	

Lösung II:	Tris-HCl	10	mM
	EDTA	1	mM
	SDS	1	% (w/v)
	Proteinase K	0,05	% (w/v)
		pH 8,0	

CTAB/NaCl:	Hexadecyltrimethyl- ammoniumbromid	10	% (w/v)
	NaCl	700	mM

TE-Puffer:	Tris-HCl	10	mM
	EDTA	1	mM
		pH 8,0	

## Material und Methoden

---

### Durchführung

1,5 ml Übernachtskultur wurden für 5 Min. bei 3000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 0,1x SSC gewaschen, zentrifugiert, in 80 µl Lösung I aufgenommen und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 700 µl Lösung II zugeben und nochmals 1 h bei 37°C inkubiert.

Dem Zellaufschluß wurden 100 µl 5 M NaCl-Lösung und 80 µl CTAB/NaCl hinzugeben und für 10 Min. auf 65°C erwärmt.

Danach wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) gemischt. Dies musste vorsichtig geschehen, um die DNA nicht durch Scherkräfte zu zerstören. Nach Zentrifugation für 4 Min. bei 11000xg wurde die obere wässrige Phase vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (500:480:20 (v/v/v)) vorsichtig vermischt. Nachdem erneut für 4 Min. bei 11000xg zentrifugiert wurde, wurde wieder die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die DNA wurde nun mit 600 µl Isopropanol gefällt und in 5 Min. bei 13000xg sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde noch zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer gelöst.

### 2.4.2 Phenolisieren von DNA

Um evtl. vorhandene Proteine in einer DNA-Lösung zu denaturieren, wurde sie phenolisiert. Dazu wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen Rotiphenol (Phenol, gepuffert mit 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA; (Roth)) versetzt und gut gemischt. Durch Zentrifugieren für 1 Min. bei 13000 Upm wurden die beiden Phasen getrennt. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, mit 1/10 Volumen 3 N Natriumacetat (pH 5,2) und dem dreifachen Volumen 100% Ethanol vermischt. Die DNA wurde für 30 Min. bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugieren für 30 Min. bei 13000 Upm wurde die DNA pelletiert, anschließend mit 300 µl 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer aufgenommen.

## Material und Methoden

---

### 2.4.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In einem Endvolumen von 15-100 µl wurden folgende Lösungen gemischt:

10x Puffer	1/10	Volumen
Restriktions-Enzym	1	U je 10 µl
DNA-Lösung	x	µl
H <sub>2</sub> O	ad 15-100	µl

Als 10x Puffer wurden die vom jedem Hersteller zu den jeweiligen Enzymen empfohlenen Puffer verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch zehnminütiges Erhitzen auf 65°C, phenolisieren oder die Zugabe von 5xSTOP-Lösung gestoppt.

### 2.4.4 Auftrennen von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Lösungen:

50x TAE-Puffer:	Tris-Base	2	M
	Natriumacetat	1	M
	EDTA	50	mM
		pH 7,5	
5xSTOP:	Ficoll	15	% (v/v)
	EDTA	50	mM
	SDS	0,4	% (w/v)
	50x TAE-Puffer	20	µl
	Xylenblau	0,05	% (w/v)
	Bromphenolblau	0,05	% (w/v)

## Material und Methoden

---

DNA-Fragmente lassen sich in Agarosegelen mittels Elektrophorese auftrennen. Durch Vergleich der Laufstrecke mit gleichzeitig aufgetrennten Größenstandards lässt sich die Größe der einzelnen Fragmente abschätzen. Je nach Größe der Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 0,8-2% (w/v) eingesetzt. Die jeweilige Menge Agarose wurde in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst und im Mikrowellengerät geschmolzen. Nach dem Abkühlen auf ca. 70°C wurde sie mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/4 Volumen 5xSTOP versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die anschließende Elektrophorese erfolgt mit konstanter Spannung von 100 V. Das Ergebnis wurde durch Betrachtung bei UV-Licht kontrolliert und mit einem »E.A.S.Y.-System« (Herolab) als Videoprints dokumentiert.

### 2.4.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

(nach Mullis & Faloan 1987; Innis *et al.* 1990)

Das Prinzip der PCR (»polymerase chain reaction«) beruht auf der mehrfachen Wiederholung eines Zyklus aus DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Primer-Extension, bei dem zwei Oligonukleotide einen DNA-Abschnitt eingrenzen, der dadurch logarithmisch amplifiziert wird. Durch die Entdeckung von hitzestabilen DNA-Polymerasen, wie der Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* ist die Automatisierung dieses Verfahrens möglich geworden.

#### Lösungen:

10x PCR-Puffer:	Tris-HCl	100	mM
	KCl	500	mM
	MgCl <sub>2</sub>	10	mM
		pH 8,3	

Als Template DNA wurde in der Regel gereinigte DNA verwendet. Es können jedoch auch Bakterienkolonien von Agarplatten gepickt werden.

## Material und Methoden

---

### Durchführung:

In einem 500 µl Reaktionsgefäß wurden gemischt:

DNA	1	µg
10x PCR-Puffer	10	µl
5'-Primer	0,2	µM
3'-Primer	0,2	µM
dNTP-Mix	200	µM
Taq-Polymerase	2	Units
H <sub>2</sub> O	ad 100	µl

Für den dNTP-Mix wurden je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Boehringer) gemischt. Der Reaktionsansatz wurde mit 2 Tropfen Mineralöl (USB) überschichtet, um Evaporation zu vermeiden, und die eigentliche PCR-Reaktion wurde in einem Landgraf Thermocycler durchgeführt, dessen Programm wie folgt aufgebaut war:

- A: 45 s 94°C (Denaturierung des DNA-Doppelstranges)
- B: 25 Zyklen aus:
  - 1. 30 s 94°C (Denaturierung)
  - 2. 45 s 45-60°C (Hybridisierung der Primer am Template)
  - 3. 90 s 72°C (Extension der Primer in 5'-3'-Richtung)
- C: 200 s 72°C (Abschlußextension)

Nach Ablauf des PCR-Programmes wurden 10 µl des Reaktionsansatzes entnommen, mit 2,5 µl 5xSTOP-Lösung versetzt und der Erfolg wurde mit einer Agarose-gelelektrophorese überprüft.

### 2.4.6 Reinigung einer PCR-Reaktion mit dem »QIAquick PCR Purification Kit«

Nach der PCR-Reaktion musste das amplifizierte DNA-Fragment von überschüssigen Primern, Nucleotiden und Enzymen gereinigt werden. Eine schnelle Methode war durch die Verwendung der »QIAquickspin-Säulen« mit den dazugehörigen Puffern von »Qiagen« gegeben. Die Methode beruht auf der hohen Affinität des Säulenmaterials zu DNA bei hohen Salzkonzentrationen, während bei niedriger Salzkonzentration die DNA eluiert werden kann. Die Reinigung wurde wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt.

Von dem PCR-Ansatz wurde das Mineralöl entfernt und die wässrige Lösung mit 500 µl Puffer PB gemischt. Das gesamte Volumen wurde auf eine Quickspin-Säule gegeben und für 1 Min. bei 13000 Upm in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Um die Verunreinigungen herauszuwaschen, wurden 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und erneut für 1 Min. bei 13000 Upm zentrifugiert. Das DNA-Fragment konnte anschließend durch Zentrifugation für 1 Min. bei 13000 Upm mit 50 µl H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer eluiert werden.

### 2.4.7 Klonierung von PCR-Produkten

Die Nukleotidsequenz der PCR-Primer wurde so verändert, daß sie Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme enthielten. Dabei wurden solche Enzyme ausgewählt, die überstehende Enden (»sticky ends«) produzierten. Um die korrekte Klonierung zu vereinfachen, wurden die Primer-Paare so konzipiert, daß zwei verschiedene »sticky ends« entstanden. So wurde erstens die spontane Selbstligation verhindert, und zweitens bei der anschließenden Ligation die korrekte Orientierung der klonierten Fragmente sichergestellt. Der Vektor wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aufgeschnitten und anschließend mit alkalischer Phosphatase (AP) behandelt. Dieses Enzym entfernt die Phosphatgruppen von den 5'-Enden der DNA. Somit ist der Ringschluß des Plasmids nur noch durch den Einbau eines Inserts möglich, welches die erforderlichen Phosphatgruppen einbringt.



## Material und Methoden

---

### Dephosphorylierung:

10x AP-Puffer:	Tris-HCl	500	mM
	EDTA	1	mM
			pH 8,5

Reaktionsansatz:	DNA	50	pmol
	10xAP-Puffer	10	µl
	AP (Boehringer)	1	Unit
	H <sub>2</sub> O	ad 100	µl

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend phenolisiert, um die Reaktion zu stoppen und die DNA zu reinigen.

### Ligation mit T4-DNA-Ligase:

Reaktionsansatz:	Vektor-DNA	0,5	µg
	Insert-DNA	x	µl
	5xLigase-Puffer	4	µl
	T4-Ligase	1	Unit
	H <sub>2</sub> O	ad 20	µl

Vektor- und Insert-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die »sticky ends« der aufgeschnittenen Vektor- und Insert-DNA hybridisierten und wurden durch die T4-Ligase (Gibco BRL) kovalent verknüpft. Der Ligationsansatz wurde für 24 h bei 4°C inkubiert.

## Material und Methoden

---

### Herstellung kompetenter Zellen:

Die *E.coli*-Zellen wurden nach der  $\text{CaCl}_2$ -Methode für die Aufnahme von DNA kompetent gemacht. Eine Übernachtskultur *E.coli* TG2 wurde in 250 ml LB-Medium 1:100 verdünnt und nach 1-2 h Inkubation bei 37°C (bis zu einer  $\text{OD}_{600} \approx 0,6$ ) durch 10 Min. zentrifugieren bei 5500xg geerntet. Das Pellet wurde in 20 ml eisgekühlter 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und für 20 Min. auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml eiskalter 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung aufgenommen und für 1 h auf Eis stehen gelassen. Nun konnte man sie direkt zur Transformation verwenden oder nach Zugabe von 30% (v/v) sterilem Glycerin bei -70°C lagern. In diesem Fall wurden die Bakterienzellen vor einer Transformation langsam auf Eis aufgetaut.

### Transformation:

(nach Dagert & Ehrlich 1979)

Von einem Ligationsansatz wurden 10 µl zu 100 µl kompetenten Zellen gegeben und für 15 Min. auf Eis inkubiert. Danach folgte eine Inkubation für 5 Min. bei 37°C und eine Abkühlungsphase von 15 Min. auf Eis. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Während der Inkubation auf Eis lagert sich die DNA an den Bakterien an und wird in der kurzen Erwärmungsphase aufgenommen. Anschließend wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert, so daß sich die Zellen erholen konnten. Schließlich wurden jeweils 100-200 µl Zellsuspension auf Selektivagarplatten plattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Aus den gewachsenen Einzelkolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsanalysen der Erfolg der Klonierung überprüft.

### 2.4.8 Gerichtete Mutagenese

Um gezielt einzelne Aminosäuren eines Proteins zu verändern, können mittels der PCR Punktmutationen in das Gen eingefügt werden. Dafür wurden die PCR-Primer so konzipiert, daß sie die gewünschte mutagenisierte Nukleotidsequenz enthielten (Mutagenese-Primer). Für die Klonierung der PCR-Produkte mussten zusätzlich die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme eingebaut werden, wodurch die Mutagenese-Primer meistens sehr lang wurden (bis zu 30 Nukleotide). Für die PCR-Reaktion mussten deshalb die veränderten Hybridisierungsbedingungen berücksichtigt werden.

Um Genabschnitte in zentralen Bereichen zu mutagenisieren, wurde zunächst der Teil des Gens in einen geeigneten Vektor kloniert, der konstant bleiben sollte (Vorklon). In diesen Vorklon wurde dann das mit den Mutagenese-Primern amplifizierte DNA-Fragment kloniert.

Bei Verwendung des »Site-directed Mutagenesis«-Kits von Stratagene können Mutationen direkt in Plasmid-codierte DNA eingefügt werden. In einer PCR-Reaktion mit Mutagenese-Primern wurde das gesamte Plasmid amplifiziert. Durch den Einsatz spezieller Enzyme wurde die originale DNA abgebaut, so daß nur mutagenisierte Plasmide übrig blieb.

## Material und Methoden

---

### 2.4.9 Isolierung von Plasmid-DNA

(nach Birnboim & Doly 1979)

Um die große Anzahl an Proben nach einer Klonierung schnell zu überprüfen, wurden Plasmid-Minipräparationen durchgeführt. Von positiven Klonen wurde die DNA in großer Reinheit und Menge mit Plasmid-Maxipräp-Kits von Qiagen isoliert.

#### Plasmid-Minipräparation:

##### Lösungen:

Lösung 1:	Glucose	50	mM
	Tris-HCl	25	mM
	EDTA-Na <sub>2</sub>	10	mM
	Lysozym	0,2	% (w/v)
		pH 8,0	
Lösung 2:	NaOH	0,2	M
	SDS	1	% (w/v)
Lösung 3:	NH <sub>4</sub> -Azetat	7,5	M

Mit einem sterilen Zahnstocher wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte gepickt und in 2 ml Selektivmedium über Nacht bei 37°C kultiviert. Davon wurden 1,5 ml abgenommen, 5 Min. bei 6000xg zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lösung 1 aufgenommen und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach pipettierte man 200 µl Lösung 2 zu und kühlte den Ansatz zur Lyse der Zellen für 5 Min. auf Eis. Durch 15 Min. Neutralisierung mit 150 µl Lösung 3 auf Eis wurden Proteine und genomische DNA präzipitiert. Anschließend wurde 5 Min. bei 13000 Upm zentrifugiert, um die Verunreinigungen zu sedimentieren. Der klare Überstand wurde abgenommen, mit dem zweifachen Volumen kaltem 100% Ethanol vermischt und für 15 Min. bei -20°C inkubiert,

## Material und Methoden

---

um die DNA zu fällen. Nach Zentrifugation für 30 Min. bei 13000 Upm wurde die pelletierte DNA mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### Plasmid-Maxipräparation

Hierfür wurden die Produkte und Puffer von Qiagen verwendet und die Prozedur wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt.

400 ml Selektivmedium wurden mit 100 µl Übernachtskultur angeimpft und 6-8 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 Min. bei 5500xg pelletiert, das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, die Suspension mit 10 ml Puffer P2 versetzt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P3 wurde für 30 Min. bei 15000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde 10 Min. bei 15000xg zentrifugiert, um ein klares Lysat zu erhalten. Eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte »Qiagen Tip500-Säule« wurde mit dem klaren Lysat beladen, zweimal mit Puffer QC gewaschen und die DNA mit 15 ml Elutionspuffer QF eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 11 ml Isopropanol versetzt und für 30 Min. bei 30000xg und 4°C präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500 µl H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch bei  $\lambda=260\text{nm}$  gemessen. Dabei entsprach 1 OD<sub>260</sub>-Einheit 50 µg/ml DNA.

### 2.4.10 Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung von DNA wurde das automatische Sequenziersystem Model 377A von Applied Biosystems (ABI) verwendet. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der Sanger-Technik zur enzymatischen Sequenzierung, wobei ähnlich einer PCR, ein DNA-Template amplifiziert wird. Da jedoch nur ein Primer-Oligonukleotid eingesetzt wird, kann nur ein DNA-Strang vervielfältigt werden. Außerdem sind dem Reaktionsansatz Dideoxynukleotide (ddNTP) beigemischt, denen die 3'-OH-Gruppe fehlt. Dort kann dann keine Kettenverlängerung mehr stattfinden. Da statistisch jede Position von einem ddNTP besetzt werden kann, entstehen einzelsträngige DNA-Fragmente mit genau einem Nukleotid Längenunterschied. Diese können in einer Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden.

## Material und Methoden

---

Das Herausragende an dem ABI-System ist, daß die vier ddNTP mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, weshalb auf den Gebrauch von radioaktiv markierten Reagenzien verzichtet werden kann. Da außerdem alle vier Terminatoren in einem Gemisch enthalten sind, können alle vier Nukleotide in einer Reaktion eingebaut werden. Nach der elektrophoretischen Auftrennung ergeben die Fragmente eine bunte Bandenleiter, bei der jede Bande mit ihrer Farbe für ein bestimmtes Nukleotid in der Sequenz steht. Kurz bevor eine Bande aus dem Gel herausläuft wird sie mit einem Argonlaser abgetastet. Die Farbstoffe reagieren darauf mit Aussendung eines Fluoreszenzlichtes in bestimmter Wellenlänge. Mit einem Photodetektor wird kontinuierlich die Intensität und die Wellenlänge des ausgestrahlten Lichts ermittelt. Aus diesen Meßdaten erstellt der Computer ein Chromatogramm, bei dem jeder Peak ein Nukleotid repräsentiert.

### Lösungen:

Es wurde der »Taq-Dye-Deoxy-Terminator Cycle Sequencing Kit« von ABI verwendet, der sämtliche Lösungen für den Premix sowie die Taq-Polymerase enthält. Der Premix wurde mit 900 µM ddATP, 450 µM ddTTP, 15 µM ddGTP und 4 µM ddCTP, sowie 4 Units Ampli-Taq-Polymerase angesetzt.

### Reaktionsansatz:

Premix	8	µl
DNA-Template	0,5	µg
Primer-Oligo	3,3	pmol
H <sub>2</sub> O	ad 20	µl

Der Ansatz wurde mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet.

## Material und Methoden

---

### Thermocycler-Programm:

Es wurden 25 Zyklen durchgeführt.

1. 15 s 96°C (Denaturierung)
2. 15 s 50-60°C (Hybridisierung)
3. 240 s 62°C (Extension)

### Probenaufbereitung:

Vor der Elektrophorese mussten überschüssige Primer, Nukleotide und Dye-Terminatoren entfernt werden. Um die wässrige Reaktionslösung besser vom Mineralöl trennen zu können, wurde sie zunächst mit 80 µl H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µl gestreckt. Die wässrige Phase wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 100 µl Phenol/Chloroform/Wasser (68:14:18; ABI) hinzugegeben und zweimal ca. 20 s geschüttelt. Um die Phasen zu trennen, wurde 1 Min. zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 15 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) sowie 300 µl 100% Ethanol für 30 Min. bei 13000 Upm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. In diesem Zustand war die DNA für mehrere Tage bei -20°C lagerfähig. Vor dem Gelauftrag wurde das Pellet in 3 µl Formamid/EDTA aufgenommen, 2 Min. auf 90°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt.

### Polyacrylamidgelelektrophorese:

#### Lösungen:

30% Acrylamid:	Acrylamid (Biorad)	29	g/100ml
	Bisacrylamid (Biorad)	1	g/100ml
10x TBE-Puffer:	Tris-Base	900	mM
	Borsäure	890	mM
	EDTA	28	mM

## Material und Methoden

---

Die Elektrophorese erfolgte in einem 0,2 mm dicken Gel mit 4% Acrylamid, das zwischen 25x42 cm großen Platten aus plangeschliffenem fluoreszenzfreiem Spezialglas gegossen wurde.

Für das Gel wurden:	Harnstoff	17,5	g
	30% Acrylamid-Lösung	5,6	ml
	10x TBE-Puffer	5	ml
	H <sub>2</sub> O	17,8	ml

gemischt, die Polymerisation durch Zugabe von 292 µl 10% Ammoniumpersulfat und 12,5 µl TEMED gestartet und die Lösung sofort zwischen die Glasplatten gegossen. Nach 2 h Polymerisation in horizontaler Lage wurde das Gel in den Sequenzierer eingespannt, die Proben geladen und der Gellauf gestartet.



### 2.5 Biochemische Methoden

#### 2.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

(nach Laemmli 1970)

Lösungen:

Acrylamid-Lösung: Acrylamid 30 % (w/v)  
N,N-Methylenbisacrylamid 0,8 % (w/v)

Hierfür wurde die fertige Lösung »Rotiphorese Gel 30« von Roth verwendet.

Die Gele wurden in »Minigel«-Apparaturen von Biometra hergestellt.

Trenngel:	7,5%	10%	15%
H <sub>2</sub> O	3,7 ml	2,44 ml	1,85 ml
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	1,9 ml	1,9 ml	1,9 ml
Acrylamid-Lösung	1,9 ml	2,5 ml	3,75 ml
10% SDS(w/v)	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 12 µl 25% (w/v) Ammoniumpersulfat gestartet.

Sammelgel:	5%
H <sub>2</sub> O	1,8 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	320 µl
Acrylamid-Lösung	330 µl
10 % (w/v) SDS	25 µl
TEMED	6 µl

Die Polymerisation wurde mit 10 µl 25 % (w/v) Ammoniumpersulfat gestartet.

## Material und Methoden

Laufpuffer:	Tris-Base	25	mM
	Glycin	192	mM
	SDS	0,1	% (w/v)
4x Probenpuffer:	10% (w/v) SDS	4	ml
	0,5M Tris-HCl (pH 6,8)	0,6	ml
	H <sub>2</sub> O	2,3	ml
	Glyzerin	4	ml
	2-Mercaptoethanol	0,4	ml
	5% (w/v) Bromphenolblau	0,2	ml

Alle Proben wurden vor dem Gelauftrag mit 4x Probenpuffer versetzt und für 5 Min. auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde mit konstanter Spannung von zunächst 120 V (im Sammelgel) und später 180 V (im Trenngel ) durchgeführt.

### 2.5.2 Coomassie-Färbung

#### Lösungen:

Färbelösung:	Coomassie Brilliant Blue R 250	0,1	% (w/v)
	Isopropanol	25	% (v/v)
	Essigsäure	10	% (v/v)
	H <sub>2</sub> O	65	% (v/v)
Entfärber:	Essigsäure	10	% (v/v)
	Methanol	40	% (v/v)
	H <sub>2</sub> O	50	% (v/v)

Das Gel wurde für 15 Min. in Färbelösung getaucht und anschließend wieder entfärbt. Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert und für die dauerhafte Lagerung in einem Gelrockner (Biorad) getrocknet.

## Material und Methoden

---

### 2.5.3 Western-Blot

(nach Kyhse-Andersen 1984)

#### Lösungen:

Blotpuffer:	Tris-Base	50	mM
	Glycin	39	mM
	SDS	1,3	mM
	Methanol	20	% (v/v)
Ponceau-Färber:	Ponceau S (Sigma)	0,25	% (w/v)
	Methanol	40	% (v/v)
	Essigsäure	15	% (v/v)
	H <sub>2</sub> O	45	% (v/v)

Für die spätere Immunfärbung müssen die aufgetrennten Proteine zunächst auf eine Trägermembran transferiert werden. Es wurde die PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran »Immobilon P« von Millipore verwendet.

Die Gele wurden nach der Elektrophorese 2 Min. in Blotpuffer äquilibriert, ebenso wie die Immobilon-Membran, die vorher durch kurzes Benetzen mit Methanol aktiviert wurde. Danach wurden auf die mit Blotpuffer befeuchtete Anoden-Graphitplatte zwei Lagen Filterpapier (Whatman, in Blotpuffer getränkt), die Immobilon-Membran, das SDS-Gel und noch zwei Lagen Filterpapier geschichtet, die Kathoden-Graphitplatte aufgelegt und der Blot bei konstantem Strom von 60 mA je aufgelegtem Gel durchgeführt.

Um den Transfer zu überprüfen und die Lage der Molekulargewichtsmarker zu kennzeichnen, wurde der Blot reversibel mit Ponceau gefärbt. Dazu wurde die Membran einige Sekunden in die Ponceau-Lösung getaucht und mit H<sub>2</sub>O entfärbt, bis Banden erkennbar waren. Die Markerbanden konnten nun mit Bleistift markiert werden. Anschließend wurde mit H<sub>2</sub>O vollständig entfärbt.

## Material und Methoden

---

### 2.5.4 Immunfärbung und Chemolumineszenz

#### Lösungen:

TBS-T:	Tris-HCl	20	mM
	NaCl	137	mM
	Tween 20	0,1	% (v/v)
		pH 7,6	

Absättigungspuffer:	FCS in TBS-T	10 % (v/v)
---------------------	--------------	------------

#### Absättigen:

Um alle freien unspezifischen Bindungsstellen der Membran zu blockieren, wurde sie nach einmaligem Waschen in TBS-T über Nacht bei 4°C in Absättigungspuffer inkubiert.

#### Inkubation mit Antikörper:

Die spezifische Markierung von Proteinen mit Antikörpern erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur. Monoklonale Antikörper wurden als Hybridoma-Überstand eingesetzt, während polyklonale Antikörper in Absättigungspuffer bis zu 2500-fach verdünnt wurden. Nach dem Waschvorgang für jeweils 10 Min. mit TBS-T, TBS-T+0,5 M NaCl, TBS-T+0,5% Triton X-100 und TBS-T wurden die Primärantikörper mit Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern markiert.

#### Chemolumineszenz:

Das Nachweisverfahren mit Chemolumineszenz beruht darauf, daß die Peroxidaseaktivität, welche an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, bei Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Luminol oxidiert. Dabei wird Licht freigesetzt, welches einen Röntgenfilm belichtet.

Es wurde der ECL-(»Enhanced-Chemoluminescence«)-Kit von Amersham eingesetzt. Die Substratlösung wurde den Angaben des Herstellers entsprechend angesetzt.

## Material und Methoden

---

Die Blotmembran wurde für ca. 1 Min. bei Raumtemperatur mit dem ECL-Substrat inkubiert. Nach kurzem Abtropfenlassen der Flüssigkeit wurde die Membran in Cellophanfolie eingeschlagen und mit ihr für ca. 2-60 s ein Röntgenfilm (KODAK X-OMAT AR) durch Auflegen exponiert. Dieser wurde in einer Entwicklungsmaschine (AGFA CURIX 50) entwickelt.

### 2.5.5 Herstellung von Extrakten aus Gewebekulturzellen

Von einer dicht bewachsenen Zellkultur-Petrischale (ø 10 cm) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 350 µl PBS aufgenommen, mit einem Zellschaber (Nunc) abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 170 µl 4x Probenpuffer versetzt. Durch die freigesetzte DNA erhalten die Proben eine gelartige Konsistenz, die jedoch nach Erhitzen auf 95°C unter starkem Schütteln verschwindet. Die Proben wurden für 1 Min. bei 13000 Upm zentrifugiert und das Pellet verworfen.

### 2.5.6 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Herstellung größerer Mengen an rekombinantem Protein wurde das Gen unter Berücksichtigung des Leserasters in den Vektor pGEX-2TK (Pharmacia) kloniert. Dieser Vektor bietet die Möglichkeit, das gewünschte Protein in Fusion mit der Glutathion-S-Transferase (GST) von *E.coli* exprimieren zu lassen. Der Vorteil besteht in einer einfachen Zellaufschluß- und Proteinreinigungsmethode. GST bindet sehr stark an sein Substrat Glutathion. Das Fusionsprotein läßt sich somit spezifisch an eine Glutathion-Sepharose-Matrix binden und anschließend mit freiem Glutathion eluieren. Weiterhin ist der Vektor so konzipiert, daß zwischen dem GST-Teil und dem spezifischen Protein eine kurze Aminosäuresequenz eingefügt ist, die genau der Spaltungssequenz der Protease Thrombin entspricht. Dadurch ist es möglich von der Glutathion-Affinitätsmatrix selektiv das gewünschte Protein ohne GST-Anteil zu eluieren.

## Material und Methoden

---

### Lösungen:

IPTG-Lösung:	Isopropyl-	100	mM (sterilfiltriert)
	β-D-galactopyranosid		
Elutionspuffer:	reduziertes Glutathion	20	mM
	in TBS pH 9,0		
Thrombin-Lösung:	Thrombin	500	Units
	in PBS	500	μl

Das pGEX-2TK-Konstrukt wurde in *E.coli* BL21(DE3) transformiert und eine 50 ml Vorkultur in LB<sup>amp</sup> angesetzt. Damit wurde eine 1 l Hauptkultur inokuliert, und für 4-5 h bei 37°C und 150 Upm inkubiert. Die Induktion der Fusionsproteinexpression erfolgte durch Zugabe von 10 ml IPTG-Lösung und weiteren 2 h Inkubation. Danach wurde die Kultur 10 Min. bei 13000xg zentrifugiert und das Pellet in 10 ml eiskaltem PBS mit Proteaseinhibitoren (Aprotinin, Pefabloc, Bestatin; Konzentration laut Herstellerangaben) resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer French Press aufgeschlossen und das Lysat mindestens 30 Min. bei 47000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 1,33 ml Glutathion-Sepharose (Pharmacia) gegeben, die fünfmal mit dem 10-fachen Volumen PBS gewaschen wurde. Der Ansatz wurde 1 h im Überkopf-Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Alle ungebundenen Proteine wurden durch fünfmaliges Waschen mit dem 10-fachen Matrixvolumen an PBS entfernt.

### Elution von Fusionsprotein:

Die Matrix wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und der Überstand restlos entfernt. Zur Elution wurden 850 μl Elutionspuffer zugegeben, 15 Min. geschüttelt, kurz zentrifugiert und der Überstand als Eluat abgenommen. So wurden mehrere Fraktionen gesammelt und in einer SDS-PAGE kontrolliert.

## Material und Methoden

---

### Elution von Thrombin-gespaltenem Protein:

Die Matrix wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 10 µl Thrombin-Lösung versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine PD10-Säule überführt und das abgespaltene Protein eluiert.

### 2.5.7 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

#### Lösungen:

Carbonatpuffer:	NaHCO <sub>3</sub>	0,1 M
		pH 9,6

Entwicklungsreagenz:	0,1 M Na-Citrat	6,25 ml
(immer frisch ansetzen)	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,25 ml
	H <sub>2</sub> O	12,5 ml
	o-Phenylendiamin (OPD)	10 mg
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12,5 µl

Für den ELISA wurden »Maxisorb«-Mikrotiterplatten (Nunc) verwendet. Für die Beschichtung der Platten wurde das Antigen in Carbonatpuffer aufgenommen, 50 µl pro Well aufgetragen und 2 h bei Raumtemperatur, bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit 10% (v/v) FCS in PBS mindestens 2 h bei 37°C abgesättigt (200µl/Well). Nach dreimaligem Waschen mit PBS (Microplate Washer EL 403, Biotek) wurden 100 µl Primärantikörperlösung (z.B. Hybridomüberstand) aufgetragen und 1 h bei 37°C inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte nach dreimaligem Waschen mit Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern. Diese wurden 1:1000 in Absättigungslösung verdünnt eingesetzt und ebenfalls für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 200 µl Entwicklungsreagenz zugegeben und die Farbreaktion nach ca. 10-15 Min. durch Zugabe von 50 µl 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Die Quantifizierung erfolgt photometrisch in einem Microplate Reader (Biorad, Modell 3550) bei λ=490 nm.

### 2.5.8 Subklassentest

Die Immunglobulinsubklassen der einzelnen monoklonalen Antikörper wurden im ELISA Verfahren bestimmt. Die ELISA-Platte wurde mit anti-Maus-Immunglobulin Antikörpern (Southern Biotechnologies) beschichtet, abgesättigt und die Überstände der Hybridome in je 12 Wells pipettiert. Nach dem Waschen wurden die monoklonalen Antikörper mit subklassen-spezifischen Sekundärantikörpern markiert und in der anschließenden Farbreaktion detektiert (siehe 2.5.7).

## 2.6 Untersuchung der Listerien-Motilität im zellfreien System

Der Einsatz von zellfreien Systemen erlaubt die biochemische und biophysikalische Untersuchung der Mechanismen der Listerien-Fortbewegung. Extrakte aus motilen Blutzellen wie Thrombozyten, Neutrophilen oder Makrophagen sind als Ausgangsmaterial gut geeignet, da diese Zellen eine ausgeprägte Mikrofilamentdynamik aufweisen.

### 2.6.1 Herstellung von Thrombozytenextrakten

Als Ausgangsmaterial dienen 5 Einheiten von gerade für einen Tag abgelaufener Thrombozyten-Infusionslösung, die vom Blutspendedienst in Hameln bezogen wurden.

#### Lösungen:

Waschpuffer:	NaCl	135	mM
	KCl	2,7	mM
	NaHCO <sub>3</sub>	12	mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,36	mM
	MgCl <sub>2</sub>	2	mM
	EGTA	0,2	mM
	Glucose	5,5	mM
	Albumin	0,3	%
		pH 6,5	



## Material und Methoden

---

Aufschlußpuffer:	Tris-HCl	10	mM
	EGTA	10	mM
	MgCl <sub>2</sub>	2	mM

### Waschen der Thrombozyten:

Die Waschschrirte wurden bei mindestens 18°C durchgeföhrt und es durften keine Glasgefäße benutzt werden, da sonst die Thrombozyten aktiviert wurden. Um die Thrombozyten von verunreinigenden Erythrozyten zu befreien, wurden sie auf 50 ml Röhrchen verteilt und für 15 Min. bei 1600xg zentrifugiert. Die Erythrozyten sedimentieren als rotes Pellet, während die Thrombozyten eine weißliche Schicht darüber bilden. Nun wurden die Thrombozyten vorsichtig in neue Röhrchen überföhrt und in Waschpuffer resuspendiert. Diese Waschprozedur wurde 4-5 mal wiederholt, bis keine Erythrozyten mehr vorhanden waren. Dabei wurde das Volumen der Thrombozyten-suspension schrittweise bis auf 30 ml verringert.

### Zellaufschluß:

Nach erneutem Zentrifugieren für 15 Min. bei 1600xg wurde das Pellet (ca. 3 ml) in 1 ml Aufschlußpuffer aufgenommen und Proteaseinhibitoren (je 10 µg/ml Leupeptin, Pepstatin, Chymostatin, PMSF) hinzugefügt. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung (sechsmal für 10 s Beschallung) auf Eis aufgeschlossen und anschließend für 45 Min. bei 100000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 mM ATP, 1 mM DTT und 150 mM Sucrose versetzt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

## Material und Methoden

---

### 2.6.2 Der *Listeria-in-vitro*-Motilitäts-Assay

Für den *in-vitro*-Motilitäts-Assay wurde der Stamm *Listeria monocytogenes* LUT12 (pActA3) verwendet. Dieser enthält ein zusätzliches, plasmidkodierte ActA-Gen und exprimierte daher außerordentlich viel ActA-Protein.

#### Lösungen:

Hepes-Puffer:	Hepes-Säure	10	mM
	KCl	0,1	mM
	MgCl <sub>2</sub>	1	mM
	CaCl <sub>2</sub>	0,1	mM
	Sucrose	50	mM

pH 7,7

VALAP: Vaseline : Lanolin : Paraffin 1:1:1 (w/w/w)

Die Listerien (*L.monocytogenes* LUT12 (pActA3)) wurden in BHI<sup>CE</sup>-Medium bis zur stationären Wachstumsphase (OD<sub>600</sub>=1,5) inkubiert, mit 30% (v/v) Glyzerin versetzt, als 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Ein Aliquot wurde aufgetaut, 1 Min. bei 13000 Upm zentrifugiert und die Bakterien in 25 µl Hepes-Puffer aufgenommen (ca. 6x10<sup>9</sup> Zellen/ml). Ein Ansatz für den *in-vitro*-Motilitäts-Assay wurde bei Raumtemperatur pipettiert aus:

Thrombozyten-Extrakt	4	µl
0,8% Methylcellulose	7,8	µl
20 mM ATP; 60 mM DTT; 40 mM MgCl <sub>2</sub>	1,6	µl
1,5x10 <sup>-2</sup> % DABCO	1,6	µl
30 µM Rhodamin-Aktin	0,5	µl
Listerien-Suspension	0,5	µl

## Material und Methoden

---

Nach kurzem Mischen wurden 2,5 µl des Ansatzes auf einen Objektträger gegeben und ein 20x20 mm großes Deckgläschen aufgelegt. Der Rand des Deckgläschens wurde mit VALAP versiegelt. Nach ca. 10 Min. konnten die Listerien unter dem Mikroskop im Phasenkontrast bzw. die Aktinschweife im Fluoreszenzkanal für Rhodamin betrachtet werden.

### 2.6.3 Immunodepletion von VASP

Der *in-vitro*-Motilitäts-Assay bietet die Möglichkeit, selektiv bestimmte Proteine aus dem Ansatz zu entfernen und somit ihre Beteiligung an der Aktin-Rekrutierung der Listerien zu untersuchen. Wegen ihrer hohen Spezifität eignen sich gerade monoklonale Antikörper für diesen Zweck. Mit speziell beschichteten Dynabeads (DYNAL) lassen sich dann die Antigen-Antikörper Komplexe sedimentieren.

2x10<sup>8</sup> Dynabeads (anti-Maus IgG beschichtet) wurden in 100 µl PBS mit 1 mg/ml BSA resuspendiert, zweimal gewaschen und mit 500 µl Antikörperlösung (1 mg/ml monoklonaler Antikörper in PBS+ BSA) für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Hälfte der so beschichteten Beads wurden nach zweimaligem Waschen für 2 h bei 4°C mit 20 µl Thrombozytenextrakt inkubiert und anschließend sedimentiert. Dieser 1-fach depletierte Überstand wurde mit der zweiten Hälfte Dynabeads inkubiert. Nach Sedimentierung der Beads konnte der 2-fach depletierte Überstand im *in-vitro*-Motilitäts-Assay eingesetzt werden.

### 2.7 Herstellung monoklonaler Antikörper

#### 2.7.1 Immunisierung der Mäuse

Für die Versuche wurden 4-10 Wochen alte, weibliche Balb/c-Mäuse verwendet, die vom »Zentralinstitut für Versuchstiere« in Hannover bezogen wurden. Um eine genügend große Anzahl von Lymphozyten zu erhalten, wurden 3 Mäuse parallel immunisiert und die Lymphozyten aller Mäuse für die Zellfusion verwendet. Den Mäusen wurde jeweils 30-50 µl Antigenlösung (entsprechend ca. 5-10 µg Protein) subcutan in die Hinterläufe injiziert. Die Immunisierungen erfolgten an den Tagen 17, 14, 10, 7, 4 und 1 vor der Fusion. Um die Immunreaktion zu stimulieren, wurde für die erste Immunisierung das Antigen in CFA (»complete Freund's Adjuvanz«; Sigma), für die zweite Immunisierung in IFA (»incomplete Freund's Adjuvanz«; Sigma) aufgenommen.

#### 2.7.2 Isolierung von Peritoneal-Makrophagen

Die Mäuse wurden durch Begasung mit CO<sub>2</sub> getötet und das Fell über die Bauchdecke vorsichtig abpräpariert. Mit einer feinen Kanüle (0,45 mm) wurden 4 ml eiskaltes Medium (OPTIMEM; Gibco) in die Bauchhöhle injiziert und vorsichtig massiert. Die Bauchdecke wurde mit einer Pinzette angehoben und mit einer feinen Präparierschere ein kleines Loch geschnitten, durch das mit einer sterilen Pasteurpipette das Medium mit den Makrophagen aus der Bauchhöhle abgezogen werden konnte. Die Makrophagen einer Maus wurden auf 10 Zellkultur-Petrischalen (ø 10 cm) verteilt. Vor einer Zellfusion wurden die Makrophagen als »Feeder-Zellen« in HA-Medium (s.u.) in 24-Well Platten ausplattiert.

## Material und Methoden

---

### 2.7.3 Zellfusion

(nach Peters & Baumgarten 1990)

#### Lösungen:

HA-Medium:	OPTIMEM; (Gibco)		
	+ FCS	5	% (v/v)
	+ L-Glutamin	4	mM
	+ Penicillin	50	IU/ml
	+ Streptomycin	50	µg/ml
	+ Hypoxanthin	20	mg/l
	+ Azaserin	1,5	mg/l
PEG-Lösung:	PEG 4000; (Merck)	5	g je 5 ml in Hepes-Medium
	(Polyethylenglycol)	pH 7,4	

Das PEG wurde bei 60°C gelöst und die Lösung anschließend steriltfiltriert und aliquotiert. Alle benötigten Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

#### Präparation der Lymphozyten:

Die Mäuse wurden durch Begasung mit CO<sub>2</sub> getötet und das Fell der Hinterläufe abpräpariert. Die poplitealen Lymphknoten, die sich direkt unter dem Kniegelenk befanden und wegen der starken Schwellung meist relativ leicht zu erkennen waren, wurden mit einer feinen Schere aus dem Gewebe herausgeschnitten. Nach zweimaligem Waschen in sterilem PBS wurden sie in vorgewärmtes Hepes-Medium überführt und die Gewebereste sorgfältig entfernt. Es wurde eine Zellsuspension hergestellt, indem die Lymphknoten mit einer Schere vorsichtig angeschnitten und dann zwischen den aufgerauhten Enden von Objektträgern zerrieben wurden. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei 950 Upm zentrifugiert.

## Material und Methoden

---

### Vorbereitung der Myelomzellen:

Die Myelomzellen (Ag8) wurden in OPTIMEM expandiert, so daß zum Zeitpunkt der Fusion 10 bis 12 dicht bewachsene Zellkultur-Petrischalen mit Zellen in optimalem Zustand in der logarithmischen Wachstumsphase zur Verfügung standen. Die Zellen wurden durch kräftiges Resuspendieren von den Schalen abgelöst, in ein 50 ml-Röhrchen überführt, bei 950 Upm pelletiert, mit Hepes-Medium gewaschen und nochmals zentrifugiert.

### Zellfusion:

Das Selektionsverfahren zwischen den Myelom- und Hybridomzellen basiert auf einem Enzymdefekt der Myelomzellen. Durch die Zugabe von Azaserin wurde der Hauptsyntheseweg der Purinbasen, die für die Synthese von Nukleinsäuren bereitgestellt wurden müssen, blockiert. Normale Zellen verfügen über einen Reserveweg und können deshalb bei Zugabe von Hypoxanthin überleben. Die Myelomzellen können dagegen diesen Reserveweg nicht nutzen, da sie nicht über das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase verfügen, so daß sie nach wenigen Tagen absterben. Die Lymphozyten, die nicht fusioniert haben, sind in Kultur nicht überlebensfähig, so daß in HA-Medium nur Hybridomzellen überleben, die aus der Fusion einer Myelomzelle (Immortalisierung) und eines Lymphozyten (Kompensation des Stoffwechseldefekts) hervorgegangen sind.

Die Myelomzellen wurden in Hepes-Medium aufgenommen und auf das Lymphozyten-pellet gegeben, beide Zelltypen durch Resuspendieren vermischt und zusammen bei 950 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet durch leichtes Schütteln des Röhrchens aufgelockert und im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Um die Temperatur während des folgenden Fusionsvorganges konstant auf 37°C zu halten, wurde bei den nachfolgenden Schritten der Boden des Röhrchens in das Wasserbad gehalten.

## Material und Methoden

---

Innerhalb einer Minute wurde 1 ml PEG-Lösung auf das Zellpellet getropft. Dabei wurde das Röhrchen ständig leicht geschüttelt. Nach einer weiteren Minute wurde das PEG durch schrittweise Zugabe von Hepes-Medium ausverdünnt: 1 ml in 30 s, 3 ml in 30 s und 16 ml in 60 s. Anschließend wurden die Zellen 5 Min. bei 37°C inkubiert, zentrifugiert, in HA-Medium aufgenommen und auf den vorbereiteten 24-Well Platten mit Makrophagen ausplattiert.

Nach 3-4 Tagen wurden die Zellen durch Zugabe von frischem HA-Medium versorgt, und nachdem sich nach 10 bis 14 Tagen deutlich sichtbare Zellklone entwickelt haben, wurden die Überstände der einzelnen Vertiefungen im ELISA-Verfahren auf spezifische Antikörper getestet. Die Zellklone, deren Überstände eine positive Reaktion zeigten, wurden auf 6-Well Platten expandiert und vier Aliquots eingefroren. Die Zellen wurden noch ca. drei Wochen in HA-Medium kultiviert, bevor sie in normalem OPTIMEM weiterkultiviert werden konnten.

### 2.7.4 Subklonierung

Da die einzelnen Vertiefungen der 24-Well Platten in der Regel mehrere Zellklone enthielten, mußten die Zellen durch Subklonierung vereinzelt werden, um definitionsgemäß monoklonale Antikörper (mAk) zu erhalten. Um zu vermeiden, daß in einem solchen Gemisch weniger vitale Hybridomzellen von schneller proliferierenden Zellen überwachsen wurden, wurde die Subklonierung möglichst früh durchgeführt.

Die expandierten Zellen wurden resuspendiert und die Zelldichte mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Von der Zellsuspension wurde eine Verdünnungsreihe von 1000, 500, 100, 10 und 5 Zellen/ml hergestellt. Von den jeweiligen Verdünnungsstufen wurden je 100 µl in die Vertiefungen einer vorbereiteten 96-Well Platte mit Makrophagen pipettiert, so daß man eine 96-Well Platte mit je vier Reihen mit 100, 50 bzw. 10 Zellen pro Vertiefung erhielt, sowie eine Platte, von der sechs Reihen statistisch 1 Zelle pro Vertiefung und sechs Reihen 0,5 Zellen pro Vertiefung enthielten. Das Wachstum der Zellen wurde mikroskopisch beobachtet, und nach 10 bis 14 Tagen wurden die Überstände von Vertiefungen, die nur eine Zellkolonie enthielten, auf den Gehalt an spezifischen Antikörpern getestet. Die positiven Zellklone wurden expandiert, eingefroren und der Kulturüberstand für weitere Tests aufbewahrt. Zur Sicherheit wurden die Klone in der Regel ein zweites Mal subkloniert.

### 2.7.5 Kultivierung im großen Maßstab

Um größere Mengen an Kulturüberständen zur Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern zu gewinnen, wurden die Hybridomzellen als Suspensionskulturen gehalten. 3 dicht bewachsene Petrischalen mit Zellen des betreffenden Klons wurden in eine 2 l-Plastikflasche (Falcon) umgesetzt, mit Medium auf 200 ml aufgefüllt und auf einer Rollerkulturanlage bei 37°C und 8% (v/v) CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Nach 2 bzw. 4 Tagen wurde das Medium auf 300 bzw. 400 ml aufgefüllt und 1 Woche weiter inkubiert.

### 2.7.6 Reinigung monoklonaler Antikörper über Protein G

Lösungen:

Glycin-Puffer:	Glycin	0,1 M
		pH 3,0

Tris-Puffer:	Tris-Cl	1 M
		pH 8,8

Protein G-Säule:	Protein G; (Sigma)	10 ml
	in PBS äquilibriert und in einer PD10-Säule gepackt	

Die monoklonalen Antikörper wurden aus Überständen von Hybridoma-Suspensionskulturen isoliert. Der Kulturüberstand wurde zunächst bei 10000xg abzentrifugiert, anschließend durch ein Faltenfilter filtriert und zweimal über eine Protein G-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 100 ml PBS gewaschen und die Antikörper mit Glycin-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in 1,5 ml Fraktionen gesammelt, wobei zur Neutralisation jeweils 100 µl Tris-Puffer vorgelegt wurden. Die Antikörperkonzentration der Fraktionen wurde photometrisch durch Messung der OD<sub>280</sub> bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten Konzentration wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert.



### 2.8 Herstellung polyklonaler Antikörper

Die Immunisierung der Kaninchen und die Serumgewinnung wurde von der Firma EUROGENTEC durchgeführt.

Es wurden parallel 2 Kaninchen mit jeweils 250 µl Antigenlösung (entsprechend 65 µg Protein) immunisiert. Die Immunisierung fand viermal über einen Zeitraum von 8 Wochen verteilt statt. Nach 80 Tagen wurde das Antiserum gewonnen. Das Serum wurde für 30 Min. bei 56°C hitzeinaktiviert und bei -20°C gelagert.

#### 2.8.1 Reinigung polyklonaler Antikörper über eine Affinitätsmatrix

Um aus dem Serum die spezifischen polyklonalen Antikörper anzureichern, wurde das Serum über das immobilisierte Antigen gegeben. Die unspezifischen Proteine wurden ausgewaschen und anschließend die spezifischen Antikörper eluiert. In der vorliegenden Arbeit wurde als Antigen rekombinantes p21-Arc Protein verwendet, das an die aktivierte Immunoaffinitätsmatrix »AFFIGEL 10« (BIORAD) gekoppelt wurde.

Herstellung der Affinitätsmatrix:

Lösungen:

Kopplungspuffer:	MOPS	0,1 M
	(4-Morpholinpropansulfonsäure)	pH 7,5

Absättigungslösung:	Ethanolamin	1 M (in Kopplungspuffer)
---------------------	-------------	--------------------------

In eine PD10-Säule wurden 2 ml der AFFIGEL 10- Suspension gegeben und mit 10 ml eiskaltem Wasser aktiviert. Das Antigen wurde mit 2 ml eiskaltem Kopplungspuffer verdünnt (Endkonzentration 2 mg/ml) und zur Affinitätsmatrix gegeben. Die Kopplung erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur in einem Überkopf-Schüttler. Danach wurde die Kopplungslösung entfernt und die Matrix in 2 ml Kopplungspuffer aufgenommen.

## Material und Methoden

---

Durch Zugabe von 400 µl Absättigungslösung wurden während der anschließenden Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur die freien Bindungsstellen der Matrix abgesättigt. Danach wurde die Säule mit H<sub>2</sub>O solange gewaschen, bis kein Protein mehr im Durchlauf vorhanden war. Die vorbereitete Affinitätsmatrix wurde mit PBS äquilibriert und nach Zugabe von 0,02% Na-Azid bei 4°C gelagert.

### Affinitätsreinigung der polyklonalen Antikörper:

#### Lösungen:

Waschpuffer:	Na-Azetat	0,1 M
		pH 4,8

Elutionspuffer:	Na-Azetat	0,2 M
		pH 2,7

Tris-Puffer:	Tris-Base	1 M
		pH 8,8

Von dem hitzeinaktivierten Serum wurden 10 ml mit PBS auf 50 ml verdünnt und zweimal über die Affinitätsmatrix gegeben. Die Säule wurde mit 50 ml PBS gespült, bevor unspezifische Proteine mit 10 ml Waschpuffer ausgewaschen wurden. Die Elution der spezifischen polyklonalen Antikörper erfolgte mit Elutionspuffer, wobei den aufgefangenen 1,5 ml Fraktionen je 100 µl Tris-Puffer zur Neutralisierung vorgelegt wurden. Die Antikörperkonzentration der Fraktionen wurde photometrisch durch Messung der OD<sub>280</sub> bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten Konzentration wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert.

### 2.9 Bestimmung der Epitope von Antikörpern

Für die Anwendung von Antikörpern ist es wichtig, die Epitope zu kennen. Eine schnelle Methode zum Epitop-Mapping besteht in dem Einsatz von synthetischen Peptiden, die auf Whatmanpapier immobilisiert sind (»Peptid-Scan«). Damit lassen sich lineare Epitope bestimmen. Die SPOT-Synthese (R. Frank 1992) erfolgte mit einem ABIMED AMS 422 Multiple-Peptide-Synthesizer auf vorbehandeltem Whatman 3MM Papier. Das Papier wurde derivatisiert, indem  $\beta$ -Alanin- $\beta$ -Alanin als Anker und Abstandhalter kovalent an die Hydroxylgruppen der Zellulose gebunden wurde. An die freien Aminogruppen der Alanine erfolgte die Kopplung weiterer Aminosäuren in der gewünschten Reihenfolge bis zu einer Peptidgröße von 15 Aminosäureresten. Das Auftragen der verschiedenen Aminosäuren in die jeweilige Position auf dem Whatmanpapier erfolgte automatisch. Die Peptidspots wurden dabei auf dem Papier in Reihen mit je 25 Spots verteilt. Die Peptid-Scans wurde in der GBF von der Arbeitsgruppe Dr. Frank hergestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

#### 2.9.1 Bindungstest an immobilisierte Peptide

Die Behandlung des Peptid-Scans entspricht im Prinzip der eines Western-Blots (siehe 2.5.3 und 2.5.4). Zur Kontrolle wurde der Peptid-Scan vor Gebrauch nur mit Sekundärantikörpern inkubiert, um unspezifische Wechselwirkungen der Sekundärantikörper zu erkennen. Nach dem Abwaschen der Sekundärantikörper konnte der Peptid-Scan mit spezifischen Antikörpern inkubiert werden.

## Material und Methoden

---

### Lösungen:

Absättigungspuffer:	FCS in TBS-T	10	% (v/v)
Stripping-Puffer A:	Harnstoff	8	M
	2-Mercaptoethanol	0,5	% (v/v)
	SDS	1	% (w/v)
Stripping-Puffer B:	Essigsäure	10	% (v/v)
	Ethanol	50	% (v/v)
	H <sub>2</sub> O	40	% (v/v)

### Durchführung:

Zunächst wurde der Peptid-Scan mit Absättigungspuffer über Nacht bei 4°C abgesättigt. Ein Peptid-Scan konnte mehrfach verwendet werden, wenn die gebundenen Antikörper durch eine stringente Waschprozedur wieder abgelöst wurden.

Jeder Waschschrift wurde für 10 Min. bei Raumtemperatur durchgeführt:

- 3 mal H<sub>2</sub>O
- 3 mal Stripping-Puffer A
- 3 mal Stripping-Puffer B
- 3 mal 100% Ethanol

Danach wurde das Papier getrocknet und bei -20°C gelagert, oder nach erneutem Absättigen wieder eingesetzt.

## 2.10 Klonierungen

Für die Klonierungen wurden unter Verwendung der in Tab. 1 aufgelisteten Oligonukleotide PCR-Fragmente amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen geschnitten und in den entsprechend vorbereiteten Vektor ligiert. In Tab. 2 bis Tab. 4 sind die Oligo-Paare, Restriktionsenzyme, Template-DNA und die Namen der erhaltenen Plasmide angegeben.

## Material und Methoden

**Tab. 2:** Klonierung der Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes in pGEX-2TKN.

5'-Oligo	Restriktions- enzym	3'-Oligo	Restriktions- enzym	PCR- Template	Plasmid
arp3-5'-Hind/Nco	<i>Nco I</i>	arp3-3'-Bam	<i>BamH I</i>	EST:zc76h11	arp3-pGEX
arp2-5'-Hind/Nco	<i>Nco I</i>	arp2-3'-Bam	<i>BamH I</i>	EST:mb06b10	arp2-pGEX
p41-5'-Hind/Nco	<i>Nco I</i>	p41-3'-Bam	<i>BamH I</i>	EST:zl46f04	p41-pGEX
p34-5'-Hind/Nco	<i>Nco I</i>	p34-3'-Bam	<i>BamH I</i>	EST:zn12h03	p34-pGEX
p21-5'-Hind/Nco	<i>Nco I</i>	p21-3'-Bam	<i>BamH I</i>	EST:yy68c05	p21-pGEX

**Tab. 3:** Klonierung von *actA* in pSPL109 (pFLAG-1 + ActA-C-Terminus).

5'-Oligo	Restriktions- enzym	3'-Oligo	Restriktions- enzym	PCR- Template	erhaltenes Plasmid
actAP2X	<i>Xho I</i>	actA3Bg15	<i>Bgl II</i>	genomische	p31
actAP2X	<i>Xho I</i>	actA3Bg16	<i>Bgl II</i>	DNA aus	p29
actAP2X	<i>Xho I</i>	actA3Bg17	<i>Bgl II</i>	Listerien	p27
actAP2X	<i>Xho I</i>	actA3Bg18	<i>Bgl II</i>		p30

**Tab. 4:** Klonierung von *actA* in pMPSVHE.

5'-Oligo	Restriktions- enzym	3'-Oligo	Restriktions- enzym	PCR- Template	erhaltenes Plasmid
actA5Hi2	<i>Hind III</i>	actA3Ba	<i>BamH I</i>	genom. DNA	pSPL21
actA5Hi2	<i>Hind III</i>	actA3Sa1	<i>Sal I</i>	genom. DNA	p38
actA5Hi2	<i>Hind III</i>	actA3Ba6	<i>BamH I</i>	p27 (s. Tab.4)	p32
actA5Hi2	<i>Hind III</i>	actA3Ba6	<i>BamH I</i>	p29 (s. Tab.4)	p33
actA5Hi2	<i>Hind III</i>	actA3Ba6	<i>BamH I</i>	p30 (s.Tab.4)	p34
actA5Hi2	<i>Hind III</i>	actA3Ba6	<i>BamH I</i>	p31 (s.Tab.4)	p37
<b>Klonierung in p38:</b>					
actA5Sa1	<i>Sal I</i>	actA3Ba	<i>BamH I</i>	genom. DNA	p42
actA5Sa2	<i>Sal I</i>	actA3Ba	<i>BamH I</i>	genom. DNA	p43

## Material und Methoden

In Tab.5 sind Oligo-Paare genannt, die zur »site-directed-muatagenesis« mit dem entsprechenden Kit von STRATAGENE eingesetzt wurden.

**Tab. 5:** »Site-directed« Mutagenese.

5'-Oligo	3'-Oligo	PCR-Template	erhaltenes Plasmid
5'actA-S155A	3'actA-S155A	pSPL21	p50
5'actA-S155D	3'actA-S155D	pSPL21	p51
5'actA-S155E	3'actA-S155E	pSPL21	p52

Tab.6 beschreibt die Umklonierung der mutierten *actA*-Sequenzen aus dem Klonierungsvektor pFLAG-1 (siehe Tab. 3) in den Shuttle-Vektor pAUL-A, der zur homologen Rekombination von Listerien eingesetzt wurde.

**Tab. 6:** Klonierung von *actA* in pAUL-A.

Ausgangs-plasmid	Restriktions-enzyme	Ziel-plasmid	Restriktions-enzyme	erhaltenes Plasmid	Listeria-Mutante
p30	<i>Xho I</i> + <i>EcoR I</i>	pAUL-A	<i>Sal I</i> + <i>EcoR I</i>	p47	$\Delta actA10$
p31	<i>Xho I</i> + <i>EcoR I</i>	pAUL-A	<i>Sal I</i> + <i>EcoR I</i>	p48	$\Delta actA11$

### 3 Ergebnisse

Das Mikrofilamentsystem einer eukaryontischen Zelle ist durch eine Vielfalt an Strukturen gekennzeichnet. Dicke Bündel aus Aktinfilamenten durchspannen als sogenannte Stressfasern das gesamte Zytoplasma adhärent wachsender Zellen und enden in den fokalen Adhäsionsplaques, den Kontaktstellen der Zelle mit der extrazellulären Matrix. Ein feines Geflecht aus Aktinfilamenten kennzeichnet die Führungslamelle motiler Zellen. Neben diesem Lamellipodium wird auch der Aufbau weiterer Zellfortsätze, wie der Filopodien oder der Mikrovilli vom Mikrofilamentsystem geprägt.

Aktinfilamente weisen eine starke Dynamik auf. Der ständige Auf- und Abbau der Filamente ermöglicht der Zelle, ihre Gestalt zu verändern und sogar zu wandern, wie bei einigen Blutzellen, Amöben und Fibroblasten zu beobachten ist. Diese Dynamik des Mikrofilamentsystems wird durch eine Vielzahl an Proteinen reguliert. Bakterien der Art *Listeria monocytogenes* polymerisieren nach einer Infektion Aktinfilamente an seiner Oberfläche, um sich intrazellulär fortzubewegen. Dabei rekrutieren die Listerien einige der Mikrofilament-assoziierten Proteine auf ihrer Oberfläche und nutzen somit die Physiologie der Wirtszelle zu ihrem eigenen Vorteil aus.

Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) war das erste Wirtsprotein, das *in vitro* als Ligand des listeriellen Aktin-Nukleationsfaktors ActA identifiziert wurde. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob VASP nur ein weiteres Listerien-assoziiertes Protein darstellt oder ob seine Bindung an ActA von physiologischer Bedeutung für die Aktin-vermittelte Fortbewegung der Listerien ist.

### 3.1 Einfluß von VASP auf die Aktin-Rekrutierung von *Listeria monocytogenes*.

*Listeria monocytogenes* zeigt die Fähigkeit, Aktin zu akkumulieren und zu einem Schweif umzuorganisieren, auch in zellfreien Systemen und kann sich darin fortbewegen, vergleichbar wie in infizierten Zellen beschrieben. Für diese zellfreien Systeme werden hochkonzentrierte Zellextrakte (z.B. aus *Xenopus*-Oozyten oder Thrombozyten) hergestellt. Diese Extrakte werden mit ATP als Energiequelle, DTT und DABCO als Oxidationshemmer, Methylcellulose zur Erhöhung der Viskosität und Rhodamin-markiertem Aktin zur Visualisierung der Aktin-Polymerisierung angereichert. Nach kurzer Inkubation mit Listerien können die Bakterien und ihre Aktinschweife unter dem Mikroskop beobachtet werden. Die Videoaufzeichnung im Zeitraffer ermöglicht später die Bestimmung der Fortbewegungsgeschwindigkeit der Listerien. Diese zellfreien Systeme ermöglichen die biochemische Modifikation der Zellextrakte. Es können z.B. gezielt Faktoren aus den Extrakten entfernt oder Proteine bzw. Proteinfragmente hinzugefügt werden, und deren Effekte auf die Listerienmotilität unter *in vivo* Bedingungen beobachtet werden (Carlier *et al.* 1997). VASP, dessen Bindung an das listerielle Oberflächenprotein ActA bisher nur *in vitro* gezeigt wurde, sollte aus einem Extrakt entfernt werden, um zu untersuchen, ob VASP für die Motilität der Listerien essentiell ist.

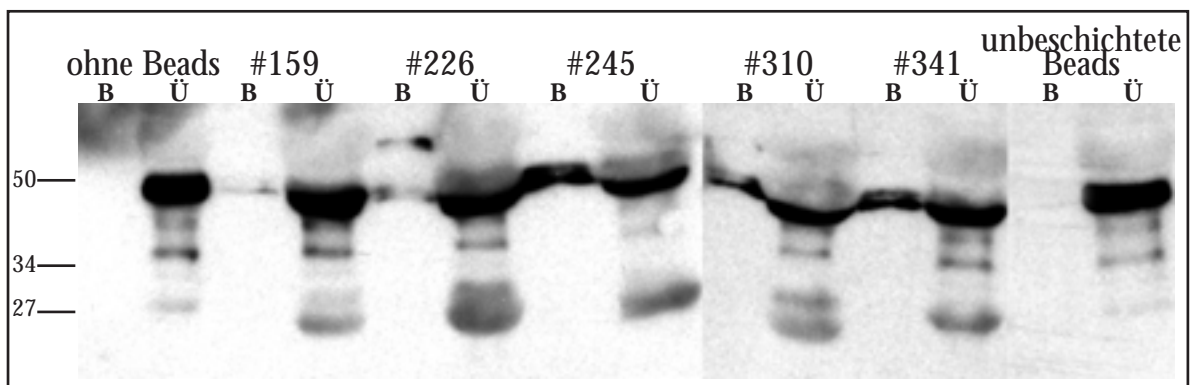
#### 3.1.1 Immunodepletion von VASP aus Thrombozytenextrakten.

Monoklonale Antikörper (mAk) sind wegen ihrer hohen Spezifität hervorragend geeignet, um Proteine aus Zellextrakten zu präzipitieren. Aus vorangegangenen Studien standen eine Reihe von monoklonalen Antikörpern gegen VASP zur Verfügung, die verschiedene Epitope erkennen (Abel 1995). Zunächst wurde untersucht, welcher dieser mAk am geeignetsten für die Immunodepletion von VASP war. Als Matrix für die Immobilisierung der mAk wurden magnetische »Dynabeads« verwendet, da sie äußerst inert gegen unspezifische Wechselwirkungen sind.



## Ergebnisse

»Dynabeads« wurden jeweils mit gereinigten mAk anti-VASP #159, #226, #245, #310 und #341 beschichtet und mit Thrombozytenextrakt (hergestellt wie in Material und Methoden 2.6.1 beschrieben) inkubiert. Anschließend wurden die Beads und deren Überstände elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die Blotmembran wurde mit polyklonalem anti-VASP Antikörper inkubiert, um zu überprüfen, wieviel VASP in den Fraktionen enthalten war.

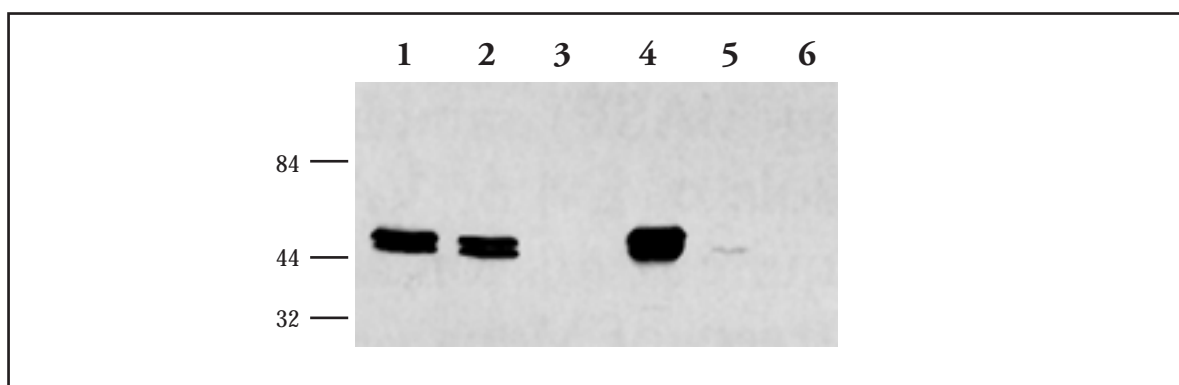


**Abb.8:** Immunpräzipitation von VASP mit monoklonalen Antikörpern. Western-Blot von Dynabeads (B) und Überständen (Ü) nach Präzipitation von VASP aus Thrombozytenextrakt. Entwicklung mit pAk anti-VASP. Die Nummern bezeichnen die verschiedenen monoklonalen anti-VASP Antikörper.

In dem Western-Blot (Abb.8) ist deutlich zu erkennen, daß die VASP-Bande von den Beads mit mAk #245 am stärksten war, gefolgt von #341 und #310. Die mAk #159 und #226 konnten nur sehr wenig VASP binden. Als Kontrollen dienten unbeschichtete Beads, bzw. unbehandelter Thrombozytenextrakt (ohne Beads). Demnach präzipitierte der mAk #245 am effektivsten VASP aus Thrombozytenextrakten.

### Immunodepletion von VASP

Nachdem sich der mAk anti-VASP #245 als der geeignete Antikörper herausstellte, wurde die Immunodepletion von VASP aus Thrombozytenextrakten durchgeführt und diese Extrakte im *Listeria-in-vitro*-Motilitätsassay untersucht. Dynabeads wurden mit mAk anti-VASP #245 beschichtet und ein Aliquot des Thrombozytenextrakts wurde zweimal mit den beschichteten Beads inkubiert.



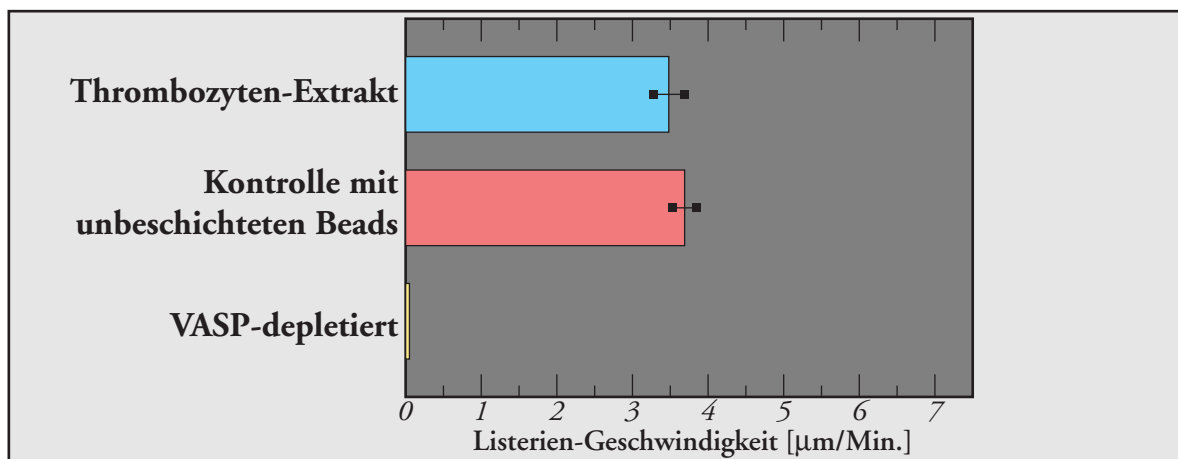
**Abb.9:** Immunodepletion von VASP mAk #245.

Der Western-Blot von VASP-depletiertem Thrombozytenextrakt wurde mit pAk anti-VASP analysiert. (1) unbehandelter Thrombozytenextrakt, (2) Überstand von unbeschichteten Kontrollbeads, (3) Überstand von zweifach depletiertem Extrakt, (4) Beads aus erstem Depletionsschritt, (5) Beads aus zweitem Depletionsschritt, (6) unbeschichtete Kontrollbeads.

In Abb.9 ist ein Western-Blot abgebildet, mit dem der Gehalt an VASP in den einzelnen Fraktionen der Immunodepletion überprüft wurde. Spur 3 zeigt, daß kein VASP mehr in zweifach depletiertem Extrakt nachweisbar war. Der überwiegende Anteil VASP wurde bereits im ersten Depletionsdurchgang präzipitiert (Spur 4), und der verbleibende Rest im zweiten Durchgang (Spur 5). In Spur 1 ist zum Vergleich die entsprechende Menge an Ausgangsmaterial aufgetragen, und die Spuren 2 bzw. 6 zeigen Überstand bzw. Pellet von Kontrollbeads, die nicht mit anti-VASP Antikörpern beschichtet wurden.

## Ergebnisse

Der Effekt der VASP Depletion wurde anschließend im *Listeria-in-vitro*-Motilitätsassay untersucht. Zweifach depletierter Extrakt wurde mit ATP und Rhodamin-Aktin angereichert und mit Listerien inkubiert (siehe Material und Methoden 2.6.2). Die videomikroskopische Auswertung ergab, daß sich die Listerien in VASP-depletiertem Extrakt nicht mehr fortbewegten, während sie in unbehandelten bzw. Kontrollextrakten Geschwindigkeiten von 3,5 bzw. 3,7  $\mu\text{m}/\text{Min.}$  erreichten (Abb.10).

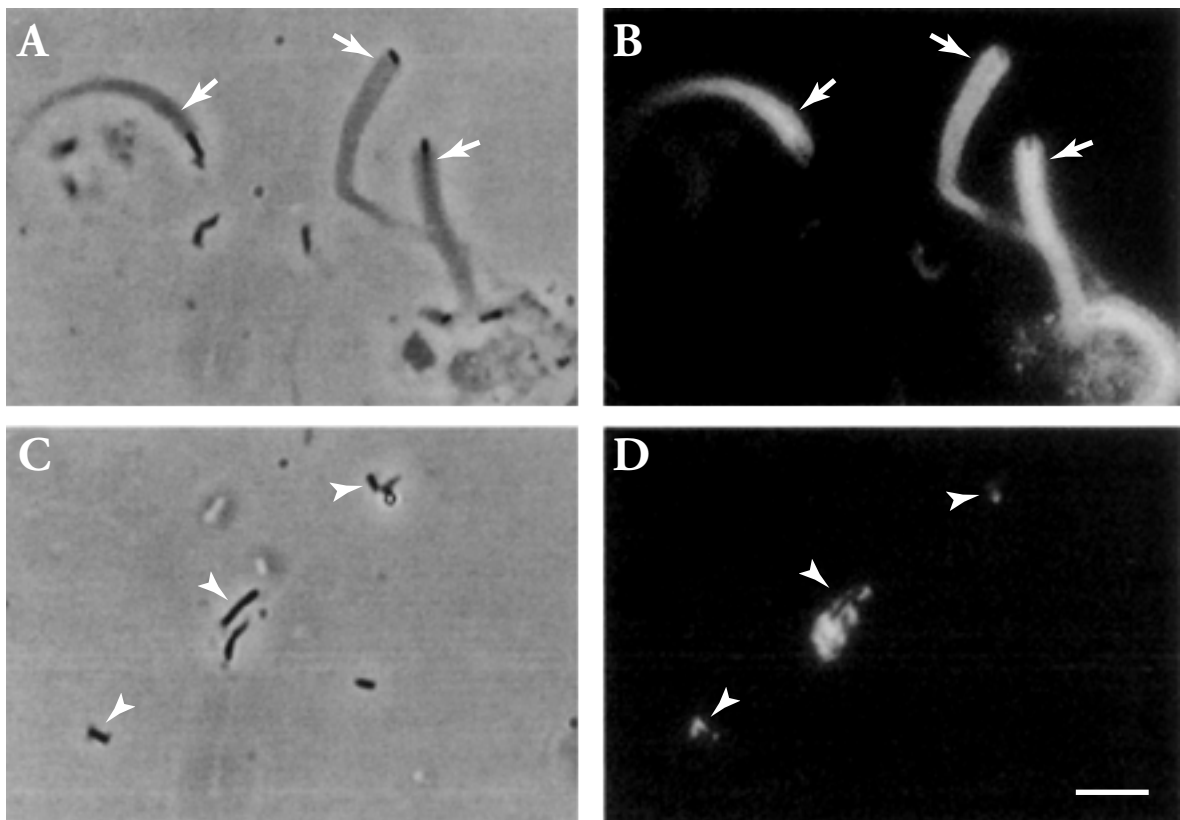


**Abb.10:** Immunodepletion von VASP.

Geschwindigkeit motiler Listerien im *in-vitro*-Motilitätsassay nach VASP-Depletion.

## Ergebnisse

Die mikroskopischen Aufnahmen (Abb.11) zeigten jedoch, daß Listerien in VASP-depletiertem Extrakt noch immer eine Wolke aus Rhodamin-Aktin an ihrer Oberfläche akkumulierten (D), aber nicht mehr in der Lage waren, dieses Aktin zu einem Schweif umzuorganisieren, wie es im Kontrollexperiment gezeigt wurde (A,B). Dies bedeutet, daß VASP für die effektive Polymerisierung von Aktinfilamenten und damit für die Formierung eines Aktinschweifes und die Motilität notwendig ist, die frühe Phase der Aktin-Akkumulation jedoch auch ohne VASP stattfinden kann.



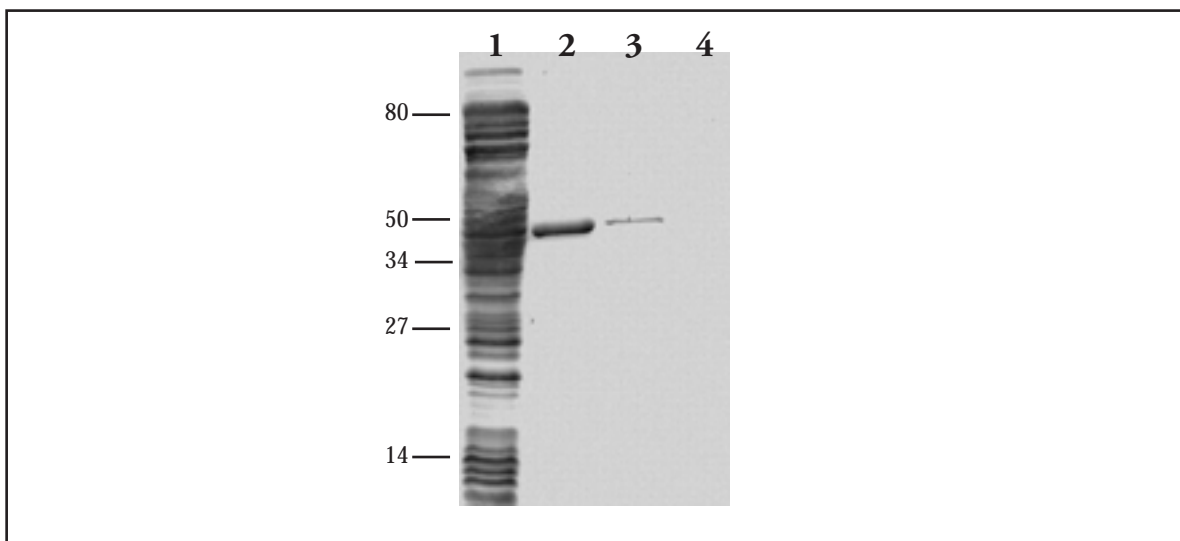
**Abb.11:** Mikroskopische Aufnahmen vom *Listeria-in-vitro*-Motilitätsassay.

Im Kontrollexperiment mit unbehandeltem Thrombozytenextrakt (A,B) sind motile Bakterien mit Aktinschweif (Pfeile) zu erkennen, während in zweifach VASP-depletiertem Extrakt (C,D) ausschließlich nicht-motile Bakterien (Pfeilspitzen) vorkommen. (A,C) sind Phasenkontrastaufnahmen und (B,D) zeigen die Rhodamin-Aktin Fluoreszenz. (Maßstabsbalken entspricht 5  $\mu$ m)

### 3.1.2 Addition von EVH1-Proteindomänen.

Sowohl für VASP, als auch für Mena wurde gezeigt, daß *in vitro* ihre Bindung an das Listerienprotein ActA über die konservierte EVH1-Domäne erfolgt (Gertler *et al.* 1996; Niebuhr *et al.* 1997). Die Addition von isolierten EVH1-Proteinfragmenten zum *Listeria-in-vitro*-Motilitätsassay sollte untersuchen, ob auch *in vivo* eine Wechselwirkung zwischen der EVH1-Domäne und ActA besteht.

Dazu wurden jeweils die EVH1-Domänen von VASP (As 1-149), Mena (As 6-170) und Evl (As 1-153) in den pGEX2TK-Vektor kloniert (freundlicherweise von Dr. U. Carl zur Verfügung gestellt) und als GST-Fusionsprotein produziert und gereinigt (siehe Material und Methoden 2.5.6). Abb.12 zeigt anhand eines Coomassie-gefärbten SDS-Gels exemplarisch die Reinigungsschritte von GST-EVH1<sub>VASP</sub>.

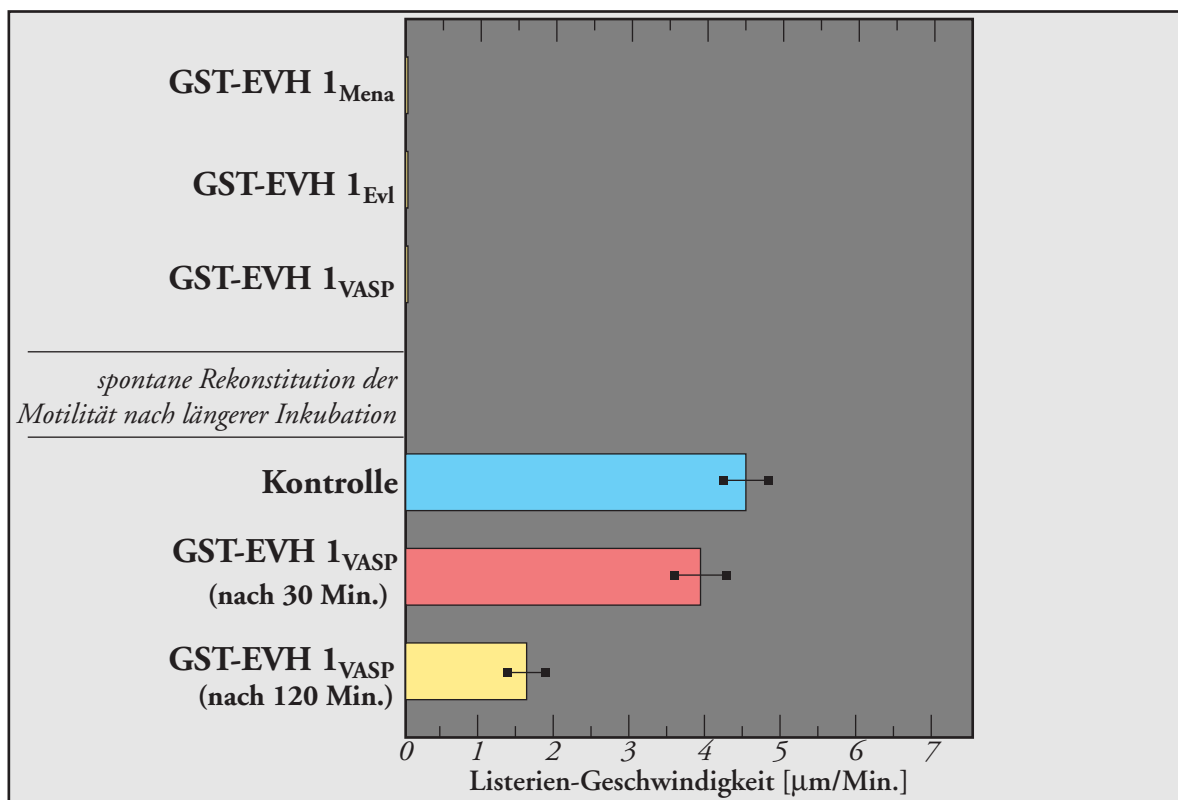


**Abb.12:** Reinigung von GST-EVH1<sub>VASP</sub>.

Das Coomassie-gefärbte SDS-Gel zeigt das Bakterienlysate (1) und die Fraktionen der Elution des GST-Fusionsproteins von der Glutathion-Sepharose (2,3,4).

## Ergebnisse

Überraschenderweise war nach der Addition der GST-EVH1-Proteine zu dem *Listeria-in-vitro*-Motilitätsassay bis zu einer Endkonzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  überhaupt keine Beeinträchtigung der Listerien-Motilität zu beobachten. Erst nach einer Vorinkubation der Listerien für 20 Min. mit den GST-EVH1-Proteinen, bevor sie zu dem Assay gegeben wurden, waren die Bakterien nicht mehr in der Lage, sich fortzubewegen. Jedoch war, wie nach der Depletion von VASP, noch eine Aktin-Wolke um die Listerien herum sichtbar. Nach längerer Inkubation im Extrakt begannen die Bakterien sich zu bewegen und Aktinschweife zu formieren. Nach 30 Min. war bei den mit GST-EVH1<sub>VASP</sub> vorinkubierten Listerien eine Geschwindigkeit von 3,9  $\mu\text{m}/\text{Min.}$  (Kontrollversuch 4,5  $\mu\text{m}/\text{Min.}$ ) zu messen. Nach 2 h betrug die Geschwindigkeit nur noch 1,6  $\mu\text{m}/\text{Min.}$ , was wahrscheinlich auf zunehmenden Verbrauch an ATP zurückzuführen war (Abb.13).



**Abb.13:** Addition von EVH1-Proteindomänen zum *Listeria-in-vitro*-Motilitätsassay. Geschwindigkeit der Bakterien nach Präinkubation mit GST-EVH1 Protein von VASP, Mena und Evl.

## Ergebnisse

---

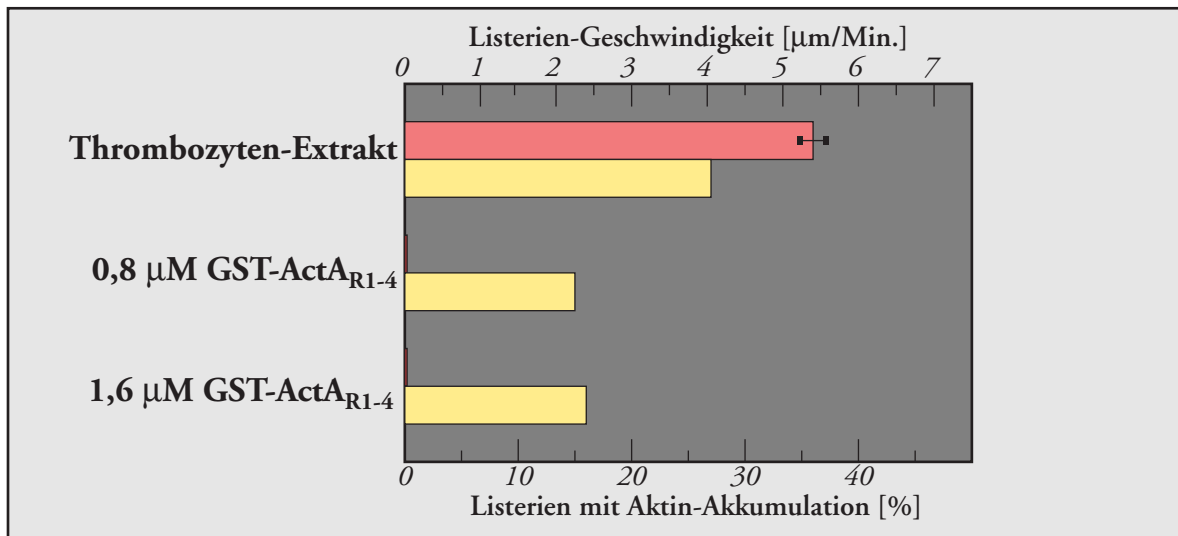
Diese Ergebnisse zeigen, daß die EVH1-Domänen von VASP, Mena und Evl mit den Listerien im Extrakt interagieren. Offensichtlich konkurrieren die zugefügten Fusionsproteine dabei mit endogenem VASP, das als komplettes Protein stärker bindet als die isolierte EVH1-Domäne. Hat VASP bereits an ActA gebunden, können die EVH1-Fragmente es nicht kompetitieren, währenddessen im Verlauf der Inkubation endogenes VASP im Extrakt die präinkubierten EVH1-Proteinfragmente von der Bakterienoberfläche verdrängt. Das endogene VASP kann dann mit seinen weiteren Domänen (EVH2 und prolinreiche Region) die Reorganisation der Aktinfilamente herbeiführen.

### 3.1.3 Addition der prolinreichen Repeatregion von ActA.

Die vorausgegangene Versuchsreihe hat gezeigt, daß komplettes VASP eine größere Bindungsstärke zu ActA hat als die isolierten EVH1-Domäne von VASP, Mena oder Evl allein. Für diese Beobachtung sind zwei Erklärungen möglich. Zum Ersten kann die Konformation der EVH1-Domäne im GST-Fusionsprotein leicht verändert sein. Demzufolge ist die Affinität zu ActA geringer als bei komplettem VASP, dessen EVH1-Domäne durch den übrigen Proteinkörper stabilisiert ist. Oder zweitens existiert neben der direkten Interaktion der EVH1-Domäne mit der prolinreichen Repeatregion von ActA noch eine weitere Wechselwirkung einer anderen VASP-Domäne mit anderen Bereichen des ActA. Wenn dies der Fall wäre, müßte diese bisher unentdeckte Wechselwirkung stärker sein als die zwischen EVH1-Domäne und prolinreicher Repeatregion. Um dies zu untersuchen wurde die prolinreiche Repeatregion von ActA (As 241-423) in den pGEX2TK-Vektor kloniert (freundlicherweise von Dr. M.Krause zur Verfügung gestellt) und das GST-ActA<sub>R1-4</sub> als Fusionsprotein dem Listeria-*in-vitro*-Motilitätsassay hinzugefügt. Die Produktion und Aufreinigung erfolgte wie beschrieben (siehe Material und Methoden 2.5.6).

## Ergebnisse

Das exogene ActA<sub>R1-4</sub>-Fragment verhindert bereits bei geringen Konzentrationen von 0,8  $\mu$ M und 1,6  $\mu$ M die Motilität der Listerien. Abb.14 verdeutlicht, daß darüber hinaus nur noch halb soviel Bakterien (15% bzw. 16%) mit Aktin assoziiert waren wie im Kontrollversuch (27%). Das bedeutet, daß es keine stärkere Wechselwirkung zwischen ActA und VASP gibt als die Bindung der EVH1-Domäne an die prolinreiche Repeatregion.



**Abb.14:** Addition der prolinreichen Repeatregion von ActA zum Listeria-*in-vitro*-Motilitätsassay. Geschwindigkeit motiler Listerien (rot) und Häufigkeit von Aktin-assoziierten Bakterien (gelb) nach Zugabe von GST-ActA<sub>R1-4</sub>.

Aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihe mit dem Listeria-*in-vitro*-Motilitätsassay lassen sich die folgenden Schlußfolgerungen ziehen. Die Wechselwirkung von VASP, Mena und Evl mit Listerien erfolgt über die direkte Bindung der EVH1-Domäne an die prolinreiche Repeatregion von ActA. Diese Interaktion ist für eine effektive Aktin-Polymerisierung und Reorganisierung der Filamente notwendig. Nur wenn VASP verfügbar ist, sind Listerien in der Lage, sich fortzubewegen. Aufgrund der Homologien zwischen VASP, Mena und Evl ist anzunehmen, daß die Mitglieder dieser Proteinfamilie untereinander austauschbar sind.

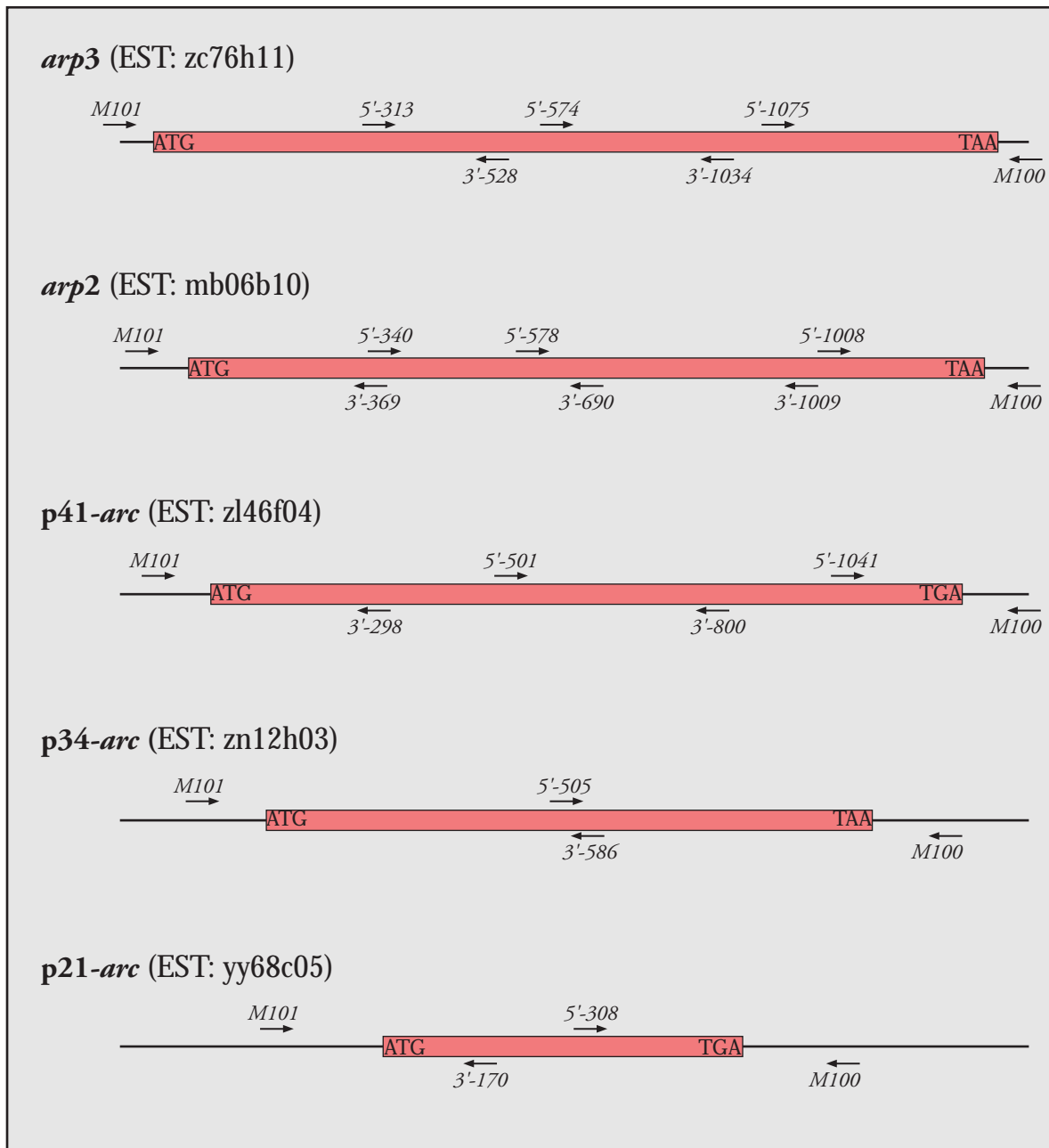


### 3.2 Sequenzierung der cDNA's für den humanen Arp2/3-Komplex.

Als zweiter zellulärer Faktor, der für die intrazelluläre Motilität der Listerien notwendig ist, konnte der Arp2/3-Komplex identifiziert werden. Voraussetzung für die Untersuchung des Arp2/3-Komplexes ist die Herstellung spezifischer Reagenzien, wie z.B. Antikörper. Dies wird durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden erheblich vereinfacht. Um die cDNAs der Gene für die Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes zu erhalten, wurde mit den bisher veröffentlichten Sequenz- und Peptidinformationen (Tanaka *et al.* 1992, Michaille *et al.* 1993, Machesky *et al.* 1994) die EST-Datenbank des »Ressourcenzentrums im deutschen humanen Genomprojekt« durchsucht und die erhaltenen Klone sequenziert. Nur wenige der erhaltenen EST-Klone beinhalteten die gesamte codierende Sequenz für das betreffende Gen. Die Abb.15 zeigt schematisch die Lage der Sequenzieroligonukleotide in den jeweiligen cDNA's. Für jedes Gen ist der EST-Klon angegeben, welcher die komplette codierende Sequenz enthält.

Ein Sequenzvergleich zwischen dem humanen und dem bovinen Arp3 ergab 96% Identität der Nukleotidsequenz und vollständige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Bei einem Alignment von humanem Arp2 und Hühner-Arp2 wurde 85% Homologie des Gens und 99% Homologie des Proteins ermittelt. Die weiteren Untereinheiten p41-Arc, p34-Arc und p21-Arc zeigten keine Homologien zu bisher bekannten Proteinen und stellen jeweils Vertreter einer neuen Proteinfamilie dar.

## Ergebnisse

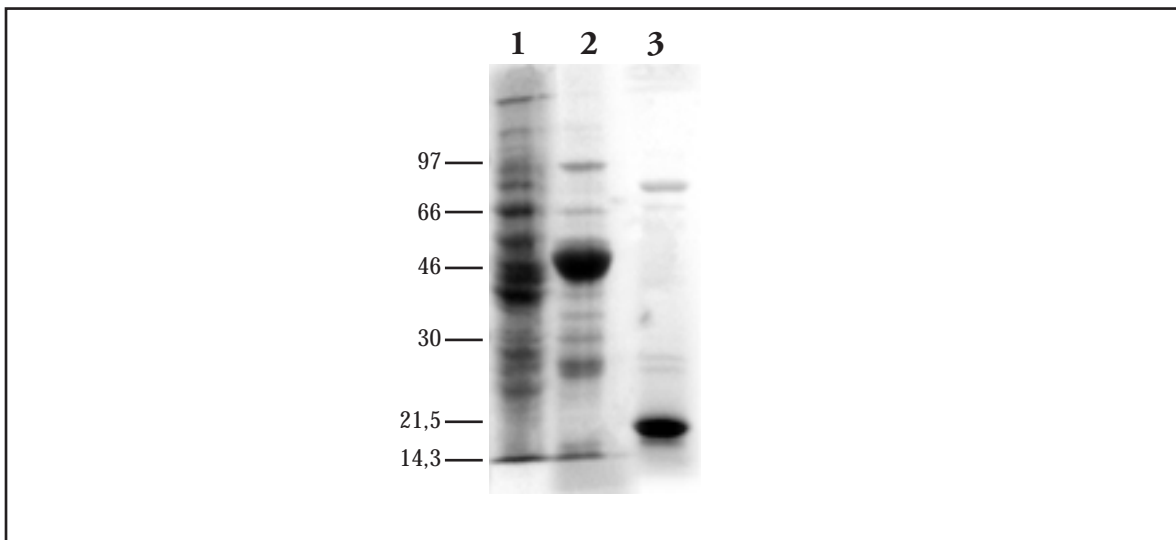


**Abb.15:** Sequenzierung der Gene für Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes.

Zu jedem Gen ist der EST-Klon genannt, der die gesamte codierende Sequenz enthält. Die Nummern über den Pfeilen bezeichnen das Sequenzier-Oligonukleotid. Der rote Balken entspricht dem codierenden Bereich.

### 3.3 Herstellung spezifischer Antikörper gegen p21-Arc.

Die Strategie zur Herstellung von Antikörpern war, die jeweiligen Untereinheiten des Arp2/3-Komplexes als GST-Fusionsproteine aufzureinigen. Aus den cDNA's wurden mittels PCR die codierenden Sequenzen amplifiziert und in den Proteinexpressionsvektor pGEX2TK von Pharmacia kloniert (siehe Material und Methoden 2.10). Nach der Transformation der Plasmide in Bakterien vom Stamm *E.coli* BL21DE3 wurden die GST-Fusionsproteine produziert. Leider zeigte sich in Vorkulturen, daß nur GST-p21-Arc stabil und ohne Degradation exprimiert wurde.



**Abb.16:** Reinigung von rekombinantem p21-Arc.

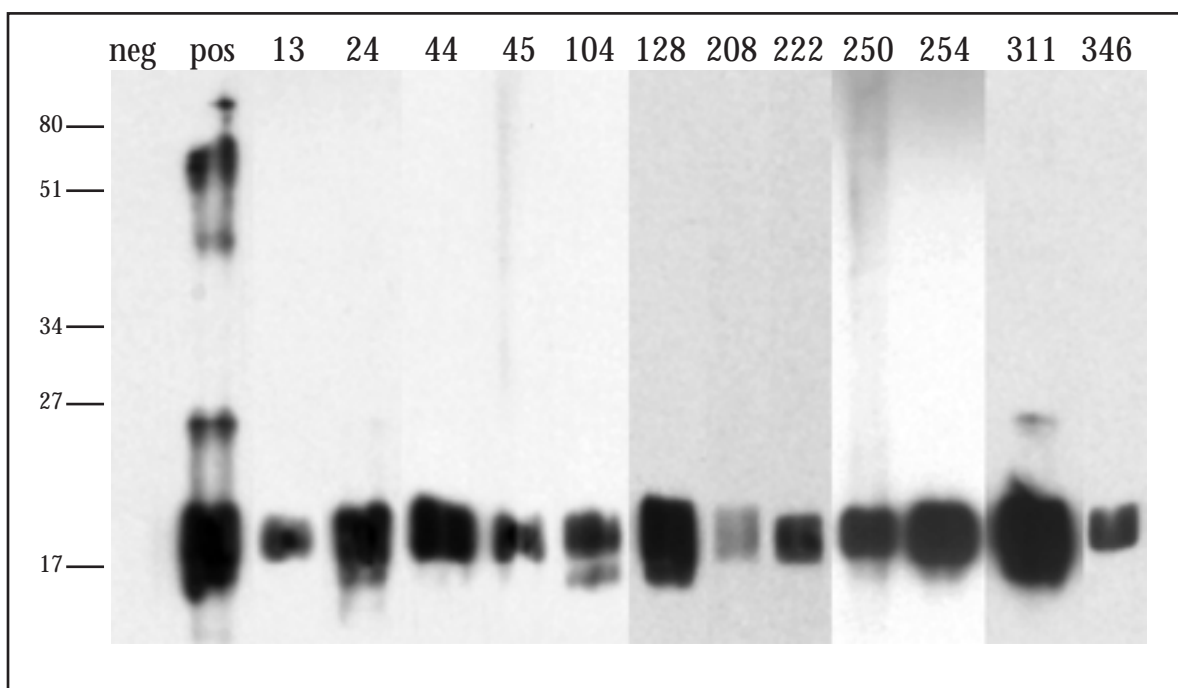
Das Coomassie-gefärbte SDS-Gel zeigt das Bakterienlysat (1), an Glutathion-Sepharose gebundenes GST-Fusionsprotein (2) und gereinigtes p21-Arc nach Abspaltung mit Thrombin (3).

Die Produktion von rekombinantem p21-Arc wurde wie beschrieben durchgeführt (Material und Methoden 2.5.6). Durch die proteolytische Abspaltung des GST-Fragments vom Fusionsprotein wurde schließlich p21-Arc in hoher Reinheit erhalten. Abb.16 zeigt anhand eines Coomassie-gefärbten SDS-Gels die verschiedenen Reinigungsschritte. Durch Aminosäureanalyse wurde eine Konzentration von 1mg/ml des gereinigten Proteins ermittelt.

## Ergebnisse

### 3.3.1 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen p21-Arc.

Mit dem rekombinanten humanen p21-Arc wurden drei Balb/c Mäuse immunisiert. Die aus der anschließenden Fusion hervorgegangenen Hybridom-Zelllinien wurden zunächst im ELISA auf ihre Reaktion mit gecoatetem Protein getestet und bei positiven Resultaten wurde eine Analyse im Western-Blot durchgeführt. Auf diese Weise konnten eine Reihe von monoklonalen Antikörpern gegen p21-Arc gewonnen werden (Abb.17).

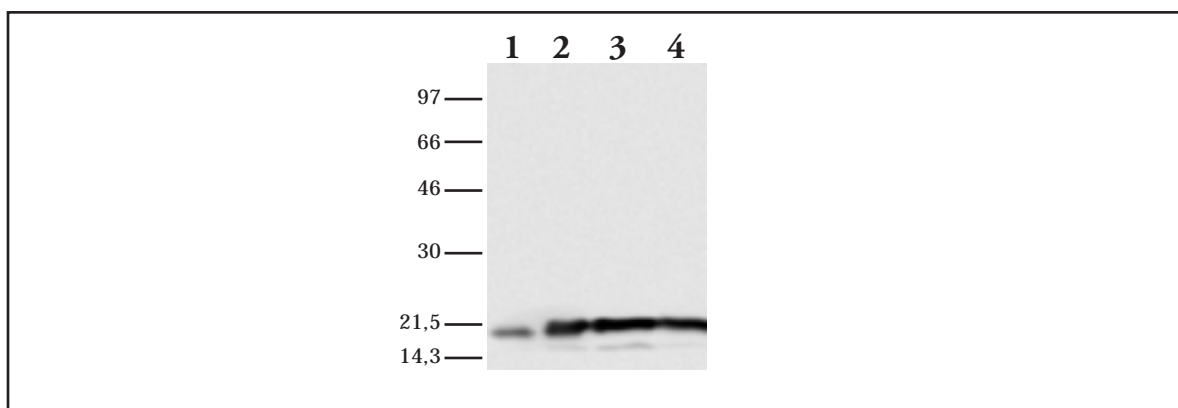


**Abb.17:** Monoklonale Antikörper gegen p21-Arc.

Der Western-Blot zeigt die Reaktion von verschiedenen mAk anti-p21-Arc mit rekombinantem Protein. Die Nummern bezeichnen den jeweiligen mAk. Als Positivkontrolle diente Serum der immunisierten Mäuse.

## Ergebnisse

Nach der Subklonierung positiver Klone zeigt Abb.18 am Beispiel von Klon #24A6, daß diese monoklonalen Antikörper im Western-Blot auch p21-Arc aus Extrakten der humanen Zelllinie HELA und aus Thrombozyten erkannten. Darüber hinaus zeigten die monoklonalen Antikörper #24A6 eine Kreuzreaktion mit p21-Arc aus Extrakten von PtK<sub>2</sub>-Zellen, einer Zelllinie, die aus der Känguruhbeutelratte *Potorous tridactylis* gewonnen wurde und bei Untersuchungen des Zytoskeletts häufig eingesetzt wird.



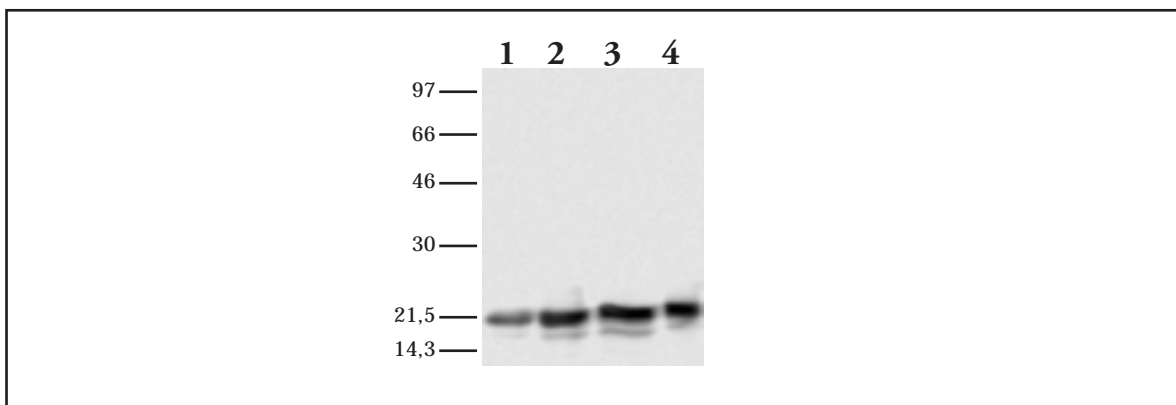
**Abb.18:** Spezifität des mAk anti-p21-Arc #24.

Der Western-Blot zeigt die Reaktion des Antikörpers mit rekombinantem p21-Arc (1) und Extrakten aus Thrombozyten (2), HELA- (3) und PtK<sub>2</sub>-Zellen (4).

### 3.3.2 Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Antikörper gegen p21-Arc.

Monoklonale Antikörper erkennen definitionsgemäß nur ein Epitop auf ihrem Antigen. In der Immunfluoreszenz-Mikroskopie sind allerdings häufig besondere Fixierungsmethoden notwendig, bei denen die Epitope zerstört werden können, was den Einsatz von monoklonalen Antikörpern in diesem Bereich einschränken kann. Für solche Anwendungen ist es von Vorteil, polyklonale Antikörper zur Verfügung zu haben. Durch die Vielfalt der Bindungsstellen sind polyklonale Antikörper auch bei anderen Anwendungen, wie z.B. Immunpräzipitationen effektiver, und können bei der Suche nach verwandten Proteinen verschiedener Spezies eingesetzt werden.

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper wurden zwei Kaninchen mit gereinigtem rekombinanten p21-Arc immunisiert. Durch Kopplung des Antigens an »AffiGel« wurde eine Affinitätsmatrix hergestellt, über welche die spezifischen Antikörper aus dem Serum aufgereinigt werden konnten. Die so erhaltenen affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper waren hochspezifisch und markierten im Western-Blot neben dem rekombinanten p21-Arc auch das Protein in HELA-, PtK<sub>2</sub>- und Thrombozyten-Extrakten (Abb.19).



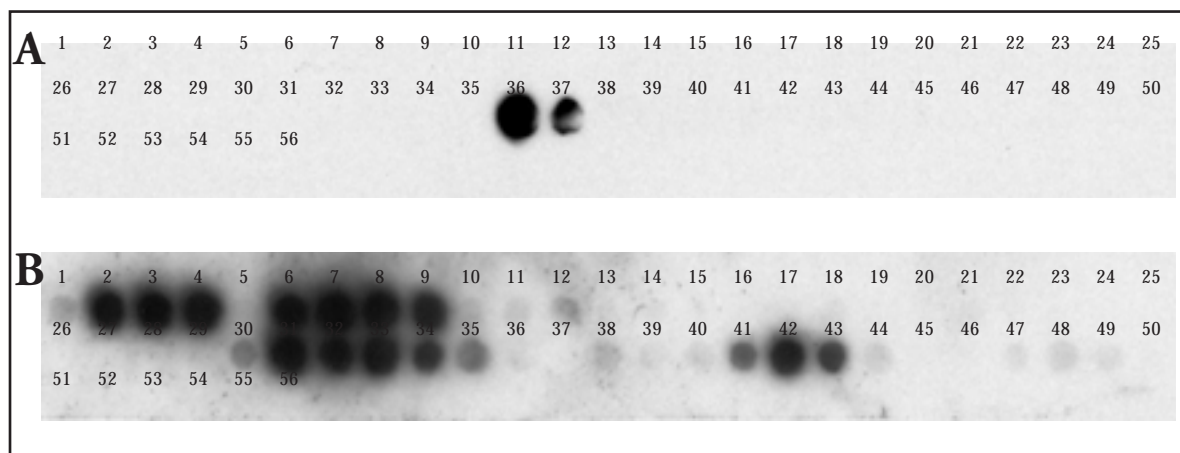
**Abb.19:** Spezifität der pAk anti-p21-Arc.

Der Western-Blot zeigt die Reaktion der affinitätsgereinigten pAk anti-p21-Arc mit rekombinantem p21-Arc (1) und Extrakten aus Thrombozyten (2), HELA- (3) und PtK<sub>2</sub>-Zellen (4).

### 3.3.3 Reaktion der monoklonalen und polyklonalen Antikörper mit synthetischen Peptiden.

Synthetische Peptide, die nach der SPOT-Methode (Frank 1992) hergestellt wurden, können wie ein Western-Blot mit Antikörpern inkubiert werden. Durch die Synthese der gesamten Aminosäuresequenz des Antigens als Peptidspots lassen sich auf diese Weise die Epitope von Antikörpern bestimmen. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß nur lineare Epitope ermittelt werden können. Da für die Herstellung der p21-Arc spezifischen Antikörper mit nativem Protein immunisiert wurde, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, daß nicht alle Epitope erfaßt werden konnten. Andererseits kann davon ausgegangen werden, daß die Epitope auf der Oberfläche des nativen Proteins exponiert sind.

Abb.20 zeigt die SPOT-Membran nach der Reaktion mit den Antikörpern. Dabei ist deutlich zu erkennen, daß der monoklonale Antikörper #24A6 nur mit zwei Peptidspots reagierte (A), also nur eine einzige lineare Aminosäuresequenz erkannte, während die polyklonalen Antikörper mit mehreren benachbarten SPOTs reagierten (B).



**Abb.20:** Epitop-Mapping von Antikörpern gegen p21-Arc.

Die gesamte Aminosäuresequenz von p21-Arc wurde als 15mer Peptide mit 12 Aminosäuren Überlappung synthetisiert und mit mAk anti-p21-Arc#24 (A) bzw. affinitätsgereinigten pAk anti-p21-Arc (B) inkubiert.

## Ergebnisse

In Tab.7 ist zusammengefaßt, welche Peptidsequenz sich auf den jeweiligen SPOTs befindet. Die überlappende Sequenz benachbarter SPOTs definiert jeweils das minimale Epitop eines Antikörpers.

**Tab.7:** Mit Hilfe der Peptidspot-Synthesemethode ermittelte Epitope der spezifischen Antikörper gegen p21-Arc.

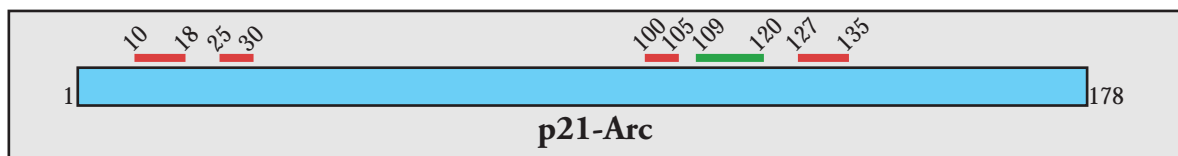
SPOT-Nr.	Peptidsequenz	Epitop	Aminosäure-Position in p21-Arc
<u>polyklonale Antikörper</u>			
2	YHSSLMDPDTKLIGN		
3	SLMDPDTKLIGNMAL		
4	DPDTKLIGNMALLPI	DPDTKLIGN	10-18
6	IGNMALLPIRSQFKG		
7	MALLPIRSQFKGPAP		
8	LPIRSQFKGPAPRET		
9	RSQFKGPAPRETKDT	RSQFKG	25-30
31	GEKEMYTLGITNFPI		
32	EMYTLGITNFPIPG		
33	TLGITNFPIPGEPGF		
34	ITNFPIPGEPGFPLN	ITNFPI	100-105
41	ANKQEDEVMRAYLQQ		
42	QEDEVMRAYLQQLRQ		
43	EVMRAYLQQLRQETG	EVMRAYLQQ	127-135
<u>monoklonaler Antikörper #24A6</u>			
36	PGEPGFPLNAIYAKP		
37	PGFPLNAIYAKPANK	PGFPLNAIYAKP	109-120



## Ergebnisse

---

Abb.21 verdeutlicht, wie die Epitope der Antikörper in der Primärstruktur von p21-Arc verteilt sind. Es fällt auf, daß die Epitope nur in zwei Regionen der Primärstruktur liegen. Es ist daher anzunehmen, daß diese zwei Bereiche oberflächenexponierte Regionen des Proteins darstellen.



**Abb.21:** Epitop-Mapping von Antikörpern gegen p21-Arc.  
Schematische Darstellung der Lage der Epitope des mAk #24 (grün) und der pAk (rot) auf der Primärstruktur von p21-Arc.

### 3.4 Funktionelle Charakterisierung von ActA.

Mit Hilfe des Mitochondrien-Targeting-Systems konnten zwei funktionelle Domänen in der ActA-Primärstruktur identifiziert werden (Pistor *et al.* 1994). An die zentrale Prolinreiche Repeatregion binden die »focal contact«-Proteine VASP und Mena (Chakraborty *et al.* 1995, Gertler *et al.* 1996, Smith *et al.* 1996), während der aminoterminal Bereich die Aktin-Rekrutierung vermittelt. Durch N-terminale Deletionen konnte die Aktin-Nukleationsdomäne auf den minimalen Bereich der As 129-153 eingegrenzt werden (Pistor *et al.* 1995, Friederich *et al.* 1995, Lasa *et al.* 1995). In dieser Domäne fällt besonders ein Motiv aus fünf basischen Aminosäuren (<sub>146</sub>KKRRK<sub>150</sub>) auf, das auch beim iActA-Protein von *Listeria ivanovii* konserviert ist (<sub>309</sub>KNRRK<sub>313</sub>), und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit eine funktionelle Rolle bei der Aktin-Rekrutierung ausübt (Gröbe 1995, Gerstel *et al.* 1996).

Um zu untersuchen, ob sich zwischen der Aktin-Nukleationsdomäne und der prolinreichen Repeatregion weitere funktionelle Domänen befinden, wurden zwei große Deletionen von 33 bzw. 76 Aminosäureresten in diesen Bereich eingefügt.

Für die detaillierte Charakterisierung der Aktin-Nukleationsdomäne wurden Mutationen einzelner Aminosäuren in das basische Pentamer eingeführt. Um das Motiv als Ganzes auszuschalten, wurden zunächst alle Aminosäurereste des Pentamers ausgetauscht (<sub>146</sub>IISII<sub>150</sub>). Vorangegangene Studien zeigten bereits, daß der Austausch einzelner Lysin-Reste keine Beeinträchtigung der ActA-Funktionalität zur Folge hatte (S. Pistor, pers. Mitteilung). Für diese Arbeit wurden daher sowohl die zwei flankierenden (<sub>146</sub>IKRRI<sub>150</sub>), als auch alle drei Lysin-Reste (<sub>146</sub>IIRRI<sub>150</sub>) gleichzeitig zur ungeladenen Aminosäure Isoleuzin mutiert. Außerdem wurde die Aminosäure Arg<sub>149</sub> durch die ebenfalls basische Aminosäure Lysin ersetzt.

Eine weitere Mutationsanalyse sollte Hinweise zur Phosphorylierung von ActA liefern. Es ist schon seit langem bekannt, daß ActA während des intrazellulären Wachstums von Listerien phosphoryliert wird (Brundage *et al.* 1993). Jedoch konnte bis heute nicht geklärt werden, ob die Phosphorylierung für die Aktivität von ActA notwendig ist oder ob es sich nur um eine unspezifische Abwehrreaktion der Wirtszelle handelt.

Die Phosphorylierung findet nicht in der prolinreichen Repeatregion statt, da ActA aus einer entsprechenden Deletionsmutante weiterhin phosphoryliert wird. Im Sequenzalignment von ActA und iActA fällt die Konservierung eines Serin-Restes in unmittelbarer Nähe zum basischen Motiv der Aktin-Nukleationsdomäne auf. Um zu untersuchen, ob dieser Aminosäurerest von funktioneller Bedeutung ist, wurden die Mutationen Ser<sub>155</sub>>Ala (nicht phosphorylierbar), sowie Ser<sub>155</sub>>Glu und Ser<sub>155</sub>>Asp eingeführt.

### 3.4.1 Charakterisierung von ActA-Konstrukten im Mitochondrien-Targeting-System.

Das Mitochondrien-Targeting-System ist eine vergleichbar schnelle Methode, um die Funktionalität verschiedener ActA-Konstrukte zu untersuchen. Es beruht auf der Tatsache, daß ActA nach der Expression in eukaryotischen Zellen an die Oberfläche der Mitochondrien dirigiert wird. Dabei fungiert der bakterielle Membrananker am Carboxyterminus des Proteins als Targetingsignal, da ein ActA-Konstrukt ohne Membrananker diffus im Zytoplasma verteilt ist. Die strikte Lokalisierung von ActA an den Mitochondrien ermöglichte es, mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie die Kolokalisierung von ActA und zellulären Proteinen zu untersuchen.

#### Deletion der Aminosäuren 163-195 bzw. 163-238 von ActA.

Um Deletionen in die ActA-Sequenz einzufügen, wurde zunächst ein Vorklon hergestellt, bei dem die N-terminalen As 30-163 in den eukaryoten Expressionsvektor pMPSVHE kloniert wurden (Plasmid p38). In diesen wurden anschließend PCR-Fragmente kloniert, welche für die C-terminalen As 196-639 bzw. 239-639 codieren, so daß die ActA-Konstrukte p42 ( $\Delta$ 163-195) und p43 ( $\Delta$ 163-238) entstanden.

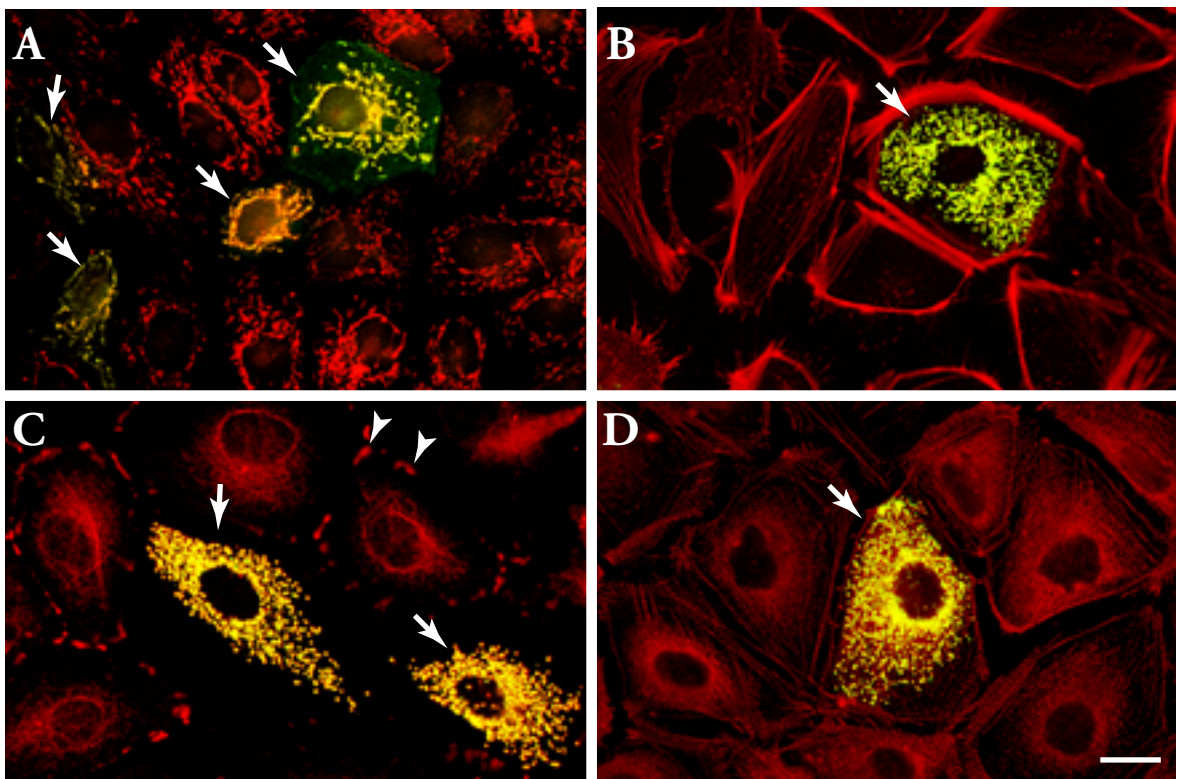
Für die Untersuchung der ActA-Konstrukte im Mitochondrien-Targeting-System wurden PtK<sub>2</sub>-Zellen mit den Plasmiden p42 bzw. p43 transfiziert und mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Als Kontrollen dienten Zellen, welche mit einem *actA* wild-typ transfiziert wurden (Plasmid pSPL21; freundlicherweise von Frau Dr. S. Pistor zur Verfügung gestellt).

In Abb.22 ist das Mitochondrien-Targeting von ActA am Beispiel von p42 gezeigt. Die gelbe Fluoreszenz zeigt die Kolokalisierung von ActA an den Mitochondrien (A). Dabei

## Ergebnisse

blieb das listerielle Protein aktiv und rekrutierte sowohl Aktin (B) als auch VASP (C) und  $\alpha$ -Actinin (D) an die Mitochondrien.

Die ActA-Konstrukte p42 und p43 mit Deletionen zwischen Aktin-Nukleationsdomäne und prolinreichen Repeats waren offensichtlich immer noch in der Lage, Aktin und VASP



**Abb.22:** Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von PtK<sub>2</sub>-Zellen nach Transfektion mit dem ActA-Konstrukt p42.

Nach der Fixierung wurden die Zellen mit pAk anti-ActA und FITC-konjugierten Sekundär-Antikörpern gefärbt (grün). Für die rote Färbung wurden (A) MITOTRACKER®, (B) Rhodamin-konjugiertes Phalloidin und (C) mAk anti-VASP, bzw. (D) mAk anti- $\alpha$ -Actinin, gefolgt von Rhodamin-konjugierten Sekundär-Antikörpern, verwendet. Die gelbe Farbe resultiert aus der Addition von roter und grüner Fluoreszenz bei Kolo-kalisierung. Die Pfeile markieren ActA-exprimierende Zellen und die Pfeilspitzen VASP in fokalen Adhäsionsplaques.

(Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m)

## Ergebnisse

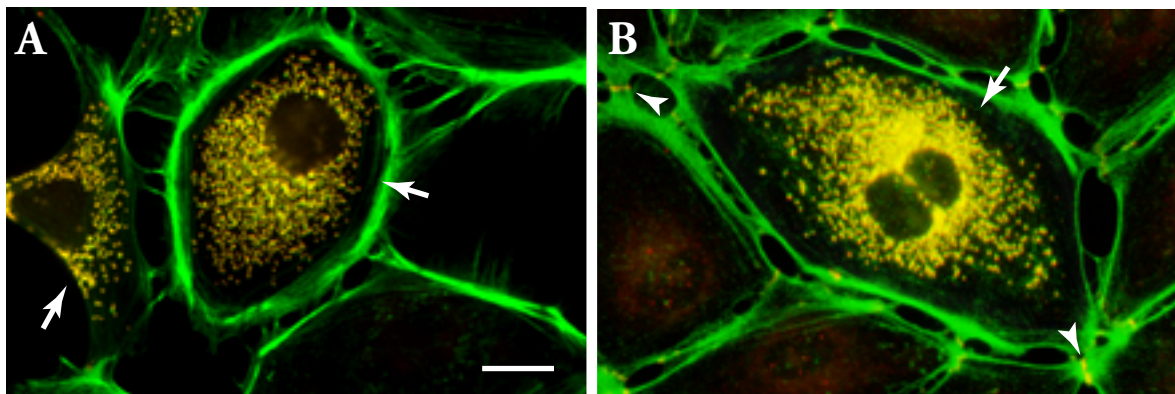
---

zu rekrutieren. Demnach bestehen in der ActA-Primärstruktur keine weiteren funktionellen Bereiche neben der bekannten Aktin-Nukleationsdomäne und der prolinreichen Repeatregion. Die Deletionskonstrukte zeigen außerdem, daß die intramolekulare Distanz zwischen den zwei funktionellen Domänen drastisch verkürzt werden kann, ohne die Rekrutierung von Aktin, VASP und  $\alpha$ -Actinin zu beeinträchtigen.

### Mutationsanalyse der Aktin-Nukleationsdomäne.

Für die Mutationen in der Aktin-Nukleationsdomäne wurde der Vorklon pSPL109 (freundlicherweise von Frau Dr. S. Pistor zur Verfügung gestellt) mit den C-terminalen As 153-639 kloniert, in den PCR-Fragmente mit dem kompletten N-terminalen Bereich (As 30-152) eingesetzt wurden, deren 3'-Enden mit Mutagenese-Primern synthetisiert wurden. Einen Überblick über die erhaltenen Plasmide p32, p33, p34, p37, p50, p51 und p52 gibt Tab.8 wieder. Nach der Transfektion von PtK<sub>2</sub>-Zellen mit den ActA-Konstrukten wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie präpariert und anschließend untersucht.

Bei der Analyse der ActA-Mutationskonstrukte waren zwei verschiedene Phänotypen zu beobachten. Die ActA-Konstrukte p33 (<sub>146</sub>IIRRI<sub>150</sub>) und p37 (<sub>146</sub>IKRRI<sub>150</sub>), sowie p50 (Ser<sub>155</sub>>Ala), p51 (Ser<sub>155</sub>>Glu) und p52 (Ser<sub>155</sub>>Asp) verhielten sich wie wild-typ ActA, d.h. sie rekrutierten Aktinfilamente und VASP an die Mitochondrien (Abb.23).

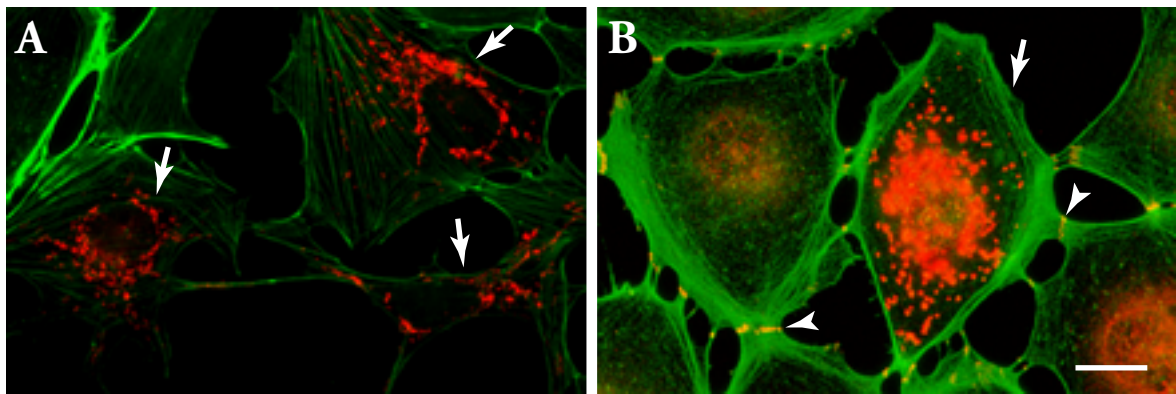


**Abb.23:** Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von PtK<sub>2</sub>-Zellen nach Transfektion mit dem ActA-Konstrukt p37.

Nach der Fixierung der Zellen wurden Aktinfilamente mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) und ActA (A) bzw. VASP (B) mit pAk und Rhodamin-konjugierten Sekundär-Antikörpern gefärbt (rot). Die gelbe Farbe zeigt die Kolokalisation von Aktin und ActA bzw. VASP an. Die Pfeile markieren ActA-exprimierende Zellen und die Pfeilspitzen VASP in fokalen Adhäsionsplaques. (Maßstabsbalken entspricht 10 µm)

## Ergebnisse

Ein anderes Bild ergab die Analyse der ActA-Konstrukte p32 ( $_{146}\text{IISSI}_{150}$ ) und p34 ( $_{146}\text{KKRKK}_{150}$ ). Sowohl die 5-fach Mutation  $_{146}\text{IISSI}_{150}$  (p32) als auch der konservative Aminosäureaustausch Arg $_{149}>$ Lys (p34) konnten zwar noch VASP binden, jedoch war die Fähigkeit, Aktinfilamente zu rekrutieren nicht mehr zu beobachten, wie am Beispiel von p32 in Abb.24 dokumentiert ist.



**Abb.24:** Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von PtK<sub>2</sub>-Zellen nach Transfektion mit dem ActA-Konstrukt p32.

Nach der Fixierung der Zellen wurden Aktinfilamente mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) und ActA (A) bzw. VASP (B) mit pAk und Rhodamin-konjugierten Sekundär-Antikörpern gefärbt (rot). Bei diesem ActA-Konstrukt ist keine Kolokalisierung von Aktin und ActA zu beobachten, während VASP weiterhin an die Mitochondrien rekrutiert wird. Die Pfeile markieren ActA-exprimierende Zellen und die Pfeilspitzen VASP in fokalen Adhäsionsplaques. (Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ )

## Ergebnisse

**Tab.8:** Analyse verschiedener ActA-Konstrukte im Mitochondrien-Targeting-System.

Plasmid	ActA	Aktin	VASP
		Akkumulation	Rekrutierung
pSPL21	wt ( <sup>146</sup> KKRRK <sub>150</sub> )	+	+
p42	Δ163-195	+	+
p43	Δ162-238	+	+
p32	<sup>146</sup> IIS <sup>150</sup>	—	+
p33	<sup>146</sup> IIR <sup>150</sup>	+	+
p34	<sup>146</sup> KKRKK <sup>150</sup>	—	+
p37	<sup>146</sup> IKRRI <sup>150</sup>	+	+
p50	S <sup>155</sup> >A	+	+
p51	S <sup>155</sup> >D	+	+
p52	S <sup>155</sup> >E	+	+

Diese Ergebnisse belegen die Vermutung, daß das zwischen ActA und iActA konservierte basische Pentamer <sup>146</sup>KKRRK<sub>150</sub> als minimales Motiv der Aktin-Nukleationsdomäne fungiert. Während Mutationen der Lysin-Reste des Pentamers zu keiner Beeinträchtigung in der Funktionalität führen, hat der konservative Aminosäureaustausch Arg<sub>149</sub>>Lys zu einem Verlust der Aktivität von ActA geführt, so daß letztlich sogar eine Aminosäure, das Arginin an Position 149, für die Funktionalität von ActA essentiell ist.

Die Frage nach der Bedeutung der Phosphorylierung von ActA konnte nicht geklärt werden. Die Mutationsanalyse hat lediglich ergeben, daß weder die Ausschaltung der möglichen Phosphorylierungsstelle (Ser<sub>155</sub>>Ala), noch die Einfügung einer zusätzlichen negativen Ladung (Ser<sub>155</sub>>Glu/Asp) zur Inaktivierung von ActA im Mitochondrien-Targeting-System führten. Der Aminosäurerest Serin-155, ob *in vivo* phosphoryliert oder nicht, ist demnach für die Aktivität von ActA ohne Bedeutung.



### 3.4.2 Charakterisierung von isogenen *Listeria actA*-Mutanten.

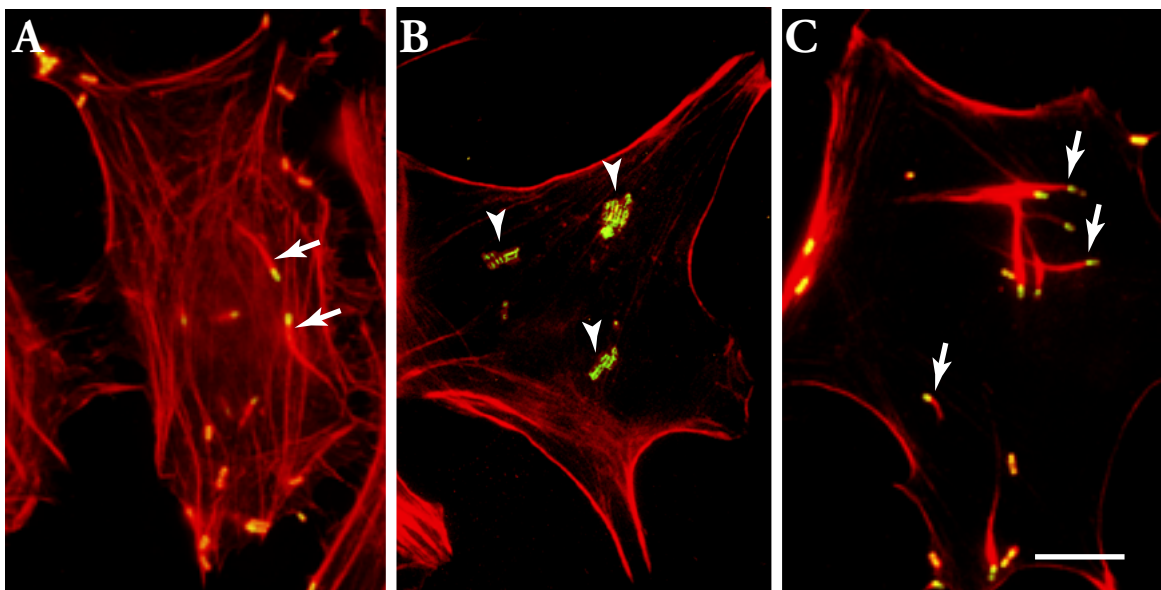
Das Mitochondrien-Targeting-System kann Hinweise zur Bindung von zellulären Faktoren an ActA geben. Das System ist jedoch dadurch limitiert, daß keine Motilität erzeugt wird, um die Auswirkungen bestimmter Veränderungen in der ActA-Sequenz auf die Formierung der Aktinschwefel zu untersuchen zu können. Damit man den realen Bedingungen möglichst nahe kommt, müssen isogene *Listeria*-Mutanten hergestellt werden, welche die Mutationen im chromosomalen Gen tragen.

Dazu wurden die mutierten *actA*-Sequenzen in den temperatursensitiven Shuttle-Vektor pAUL-A kloniert. Dieser Plasmidvektor enthält sowohl Regulationssequenzen für gram(+)-Bakterien als auch für *E.coli* (Schäferkordt *et al.* 1995). Die Klonierungsschritte können bei diesem Vektor in *E.coli* durchgeführt werden, wodurch die Arbeit wesentlich vereinfacht wird. Mit den gereinigten und durch DNA-Sequenzierung überprüften Plasmiden werden anschließend die *Listerien* transformiert. Solange die Transformanten bei 30°C kultiviert werden, bleibt das pAUL-A Plasmid extrachromosomal. Nach Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 42°C wird das Plasmid jedoch in das Bakteriengenom integriert. Dabei findet eine homologe Rekombination zwischen dem chromosomalen wild-typ *actA*-Gen und der plasmidcodierten mutierten *actA*-Sequenz statt. Läßt man diese Transformanten jetzt ohne Selektionsdruck (d.h. ohne Antibiotika) wachsen, werden die fremden Plasmidsequenzen wieder aus dem Genom entfernt. Dabei wird bei einigen Bakterien jedoch das wild-typ *actA*-Gen entfernt, so daß auf dem Bakterienchromosom nur die mutierte Variante zurückbleibt. Die so erhaltenen isogenen Mutanten können molekulargenetisch und biochemisch identifiziert und charakterisiert werden (Chakraborty *et al.* 1995). Diese isogenen *Listeria*-Mutanten haben den entscheidenden Vorteil, daß die Expression des mutierten ActA exakt so reguliert ist wie bei wild-typ Bakterien.

## Ergebnisse

Für diese Arbeit wurden isogene *Listeria*-Mutanten mit Aminosäureaustauschen in dem basischen Pentamer der Aktin-Nukleationsdomäne hergestellt. Dazu wurden die oben beschriebenen mutierten *actA*-Sequenzen aus p34 ( $_{146}\text{KKRKK}_{150}$ ) und p37 ( $_{146}\text{IKRRI}_{150}$ ) in den Plasmidvektor pAUL-A kloniert und mit den erhaltenen Plasmiden (p47 und p48) Bakterien vom Referenzstamm *L.monocytogenes* EGD transformiert. Bei der anschließenden Selektion wurden die isogenen Mutanten *L.monocytogenes*  $\Delta actA10$  ( $_{146}\text{KKRKK}_{150}$ ) und *L.monocytogenes*  $\Delta actA11$  ( $_{146}\text{IKRRI}_{150}$ ) isoliert.

Nach der Infektion von PtK<sub>2</sub>-Zellen mit den Mutanten erfolgte die Charakterisierung durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Abb.25). Dabei dienten wild-typ Bakterien *Listeria monocytogenes* EGD als Kontrolle (A).



**Abb.25:** Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von PtK<sub>2</sub>-Zellen nach Infektion mit isogenen *Listeria monocytogenes actA*-Mutanten.

4 h nach Beginn der Infektion wurden die Zellen fixiert und die Aktinfilamente mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin (rot), sowie die Listerien mit pAk anti-ActA und FITC-konjugierten Sekundär-Antikörpern (grün) gefärbt. Gezeigt sind wild-typ Listerien (A), Mutanten  $\Delta actA10$  (B) und Mutanten  $\Delta actA11$  (C). Die Pfeile markieren motile Listerien mit Aktinschweif und die Pfeilspitzen Mikrokolonien nicht-motiler Bakterien.

(Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ )

## Ergebnisse

---

Die Mutante  $\Delta actA11$ , bei der die äußeren Lysin-Reste des basischen Pentamers durch Isoleuzin ersetzt wurden, zeigte keinen veränderten Phänotyp zu wild-typ Listerien. Die Bakterien akkumulierten Aktinfilamente auf ihrer Oberfläche und reorganisierten diese zu Schweifen. Dadurch konnten sie sich in der Wirtszelle ausbreiten (C). Bei den Mutanten  $\Delta actA10$  mit der konservativen Mutation Arg-149 zu Lysin waren hingegen keine Aktinschweife zu erkennen, und diese Bakterien lagen folglich als Mikrokolonien in der Wirtszelle vor (B).

Diese Ergebnisse bestätigen, daß eine Mutation der Aminosäure Arginin-149 zum Verlust der Fähigkeit Aktin zu akkumulieren führt. Wie im Mitochondrien-Targeting-System können isogene Mutanten keine Aktinfilamente rekrutieren und daher keine Aktinschweife formieren, um sich intrazellulär fortzubewegen.

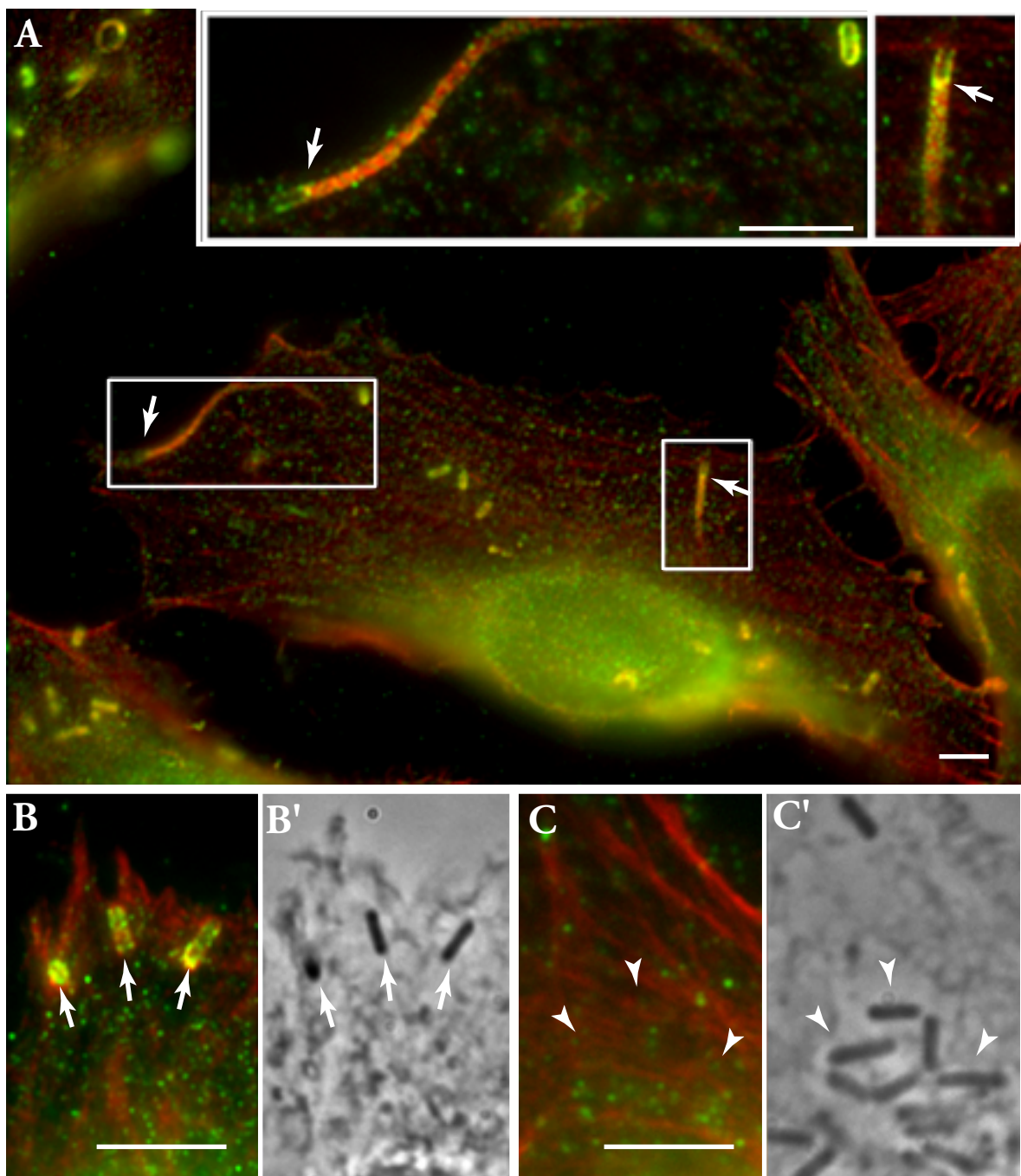
### 3.4.3 Verteilung von p21-Arc an der Oberfläche von *actA*-Mutanten.

Für die Untersuchung, welche Rolle der Arp2/3-Komplex bei der Aktin-Akkumulation von intrazellulären Listerien spielt, wurden die in dieser Arbeit vorgestellten Antikörper in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt. Gewebekulturzellen vom Typ HELA und PtK<sub>2</sub> wurden mit isogenen Listeria-Mutanten infiziert und anschließend für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie präpariert.

In Abb.26 ist dargestellt, daß der mAk anti-p21-Arc #24 in infizierten HELA-Zellen auf der Oberfläche stationärer Bakterien und im Aktinschweif motiler Listerien nachzuweisen war (A). Auch von den Mutanten  $\Delta actA5$  (Deletion der prolinreichen Repeatregion As 265-389) wurde die p21-Arc Untereinheit des Arp2/3-Komplexes rekrutiert (B), während an den Mutanten  $\Delta actA3$  (Deletion der Aktin-Nukleationsdomäne As 128-152) p21-Arc nicht nachweisbar war (C).

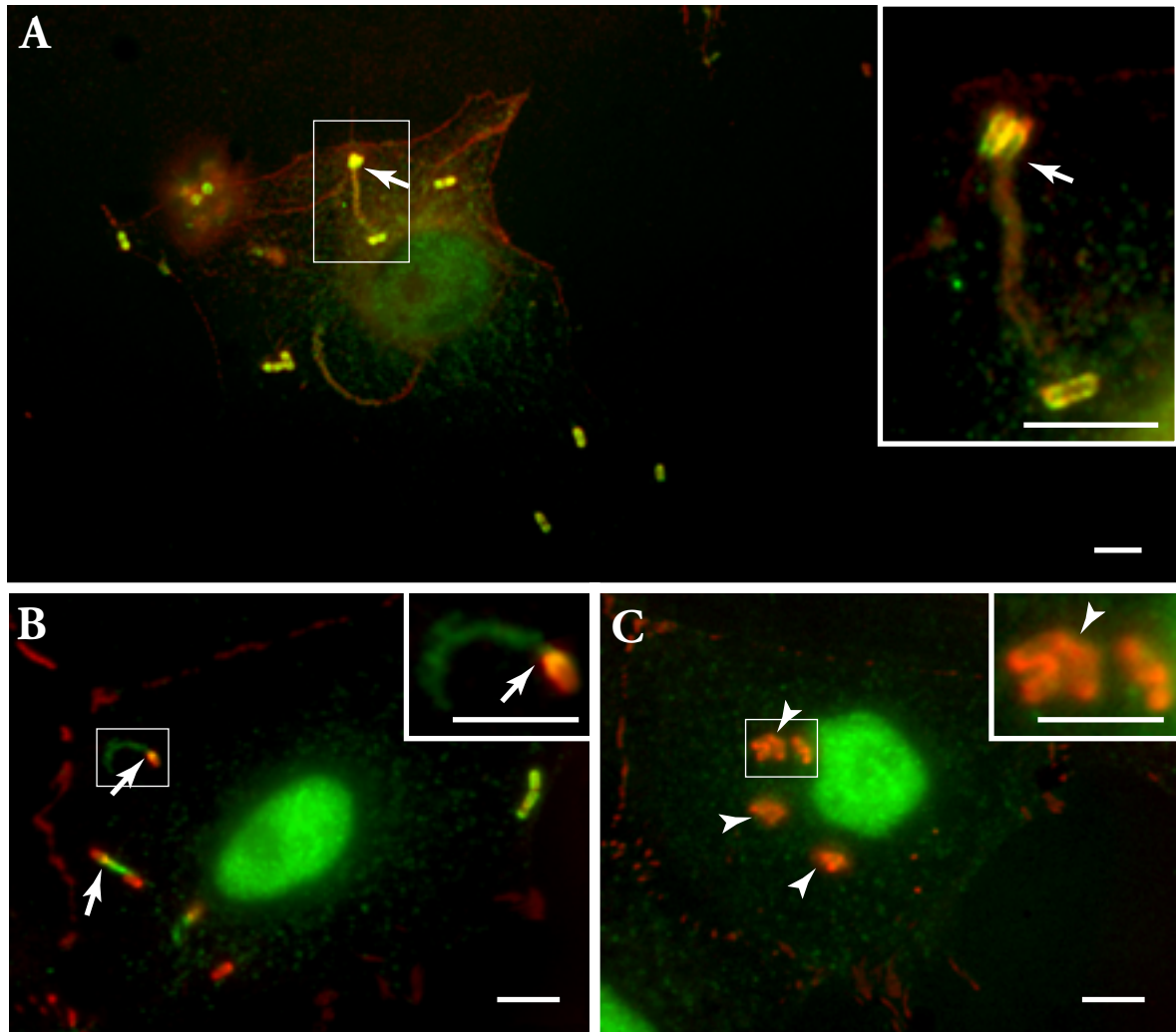
Auch in PtK<sub>2</sub>-Zellen wurde p21-Arc von motilen Listerien rekrutiert (Abb.27). Sowohl an wild-typ Bakterien (A) als auch an der isogenen Mutante  $\Delta actA11$  war p21-Arc nachweisbar (B). Die nicht-motile Mutante  $\Delta actA10$  war hingegen nicht in der Lage p21-Arc zu rekrutieren, obwohl die Bindung von Mena nicht beeinträchtigt wurde (C).

## Ergebnisse



**Abb.26:** Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von HELA-Zellen nach Infektion mit isogenen *Listeria monocytogenes actA*-Mutanten.

Die Zellen wurden 4 h nach Beginn der Infektion fixiert und Aktin mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin (rot), sowie die p21-Arc Untereinheit des Arp2/3-Komplexes mit mAk anti-p21-Arc #24 und FITC-konjugierten Sekundär-Antikörpern (grün) gefärbt. Gezeigt sind wild-typ Listerien (A), Mutanten  $\Delta actA5$  (B) und Mutanten  $\Delta actA3$  (C). (B', C') sind Phasenkontrastaufnahmen, um die Lage der Bakterien zu verdeutlichen. Die Pfeile markieren Listerien, die Aktin und p21-Arc rekrutieren, und die Pfeilspitzen eine Mikrokolonie nicht-motiler Bakterien. (Maßstabsbalken entspricht 5  $\mu$ m)



**Abb.27:** Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von PtK<sub>2</sub>-Zellen nach Infektion mit isogenen *Listeria monocytogenes actA*-Mutanten.

4 h nach Beginn der Infektion wurden die Zellen fixiert und p21-Arc mit affinitätsgereinigten pAk und FITC-konjugierten Sekundär-Antikörpern (grün) markiert. Die rote Färbung erfolgte mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin (A) bzw. mAk anti-Mena und Rhodamin-konjugierten Sekundär-Antikörpern (B, C). Gezeigt sind wild-typ Listerien (A), Mutanten  $\Delta actA11$  (B) und Mutanten  $\Delta actA10$  (C). Die Pfeile markieren motile Listerien mit Aktinschweif und Rekrutierung von p21-Arc während die Pfeilspitzen auf Mikrokolonien nicht-motiler Bakterien hinweisen. (Maßstabsbalken entspricht 5 µm)

## Ergebnisse

In Tab.9 ist die Charakterisierung der verschiedenen *Listeria actA*-Mutanten zusammengefaßt. Diese Ergebnisse zeigen, daß die p21-Arc Untereinheit des Arp2/3-Komplexes immer von jenen *actA*-Mutanten rekrutiert wird, die auch in der Lage sind Aktin zu akkumulieren. Das bedeutet, daß die Interaktion zwischen ActA und p21-Arc bzw. dem Arp2/3-Komplex von der Aktin-Nukleationsdomäne und nicht von der prolinreichen Repeatregion abhängig ist.

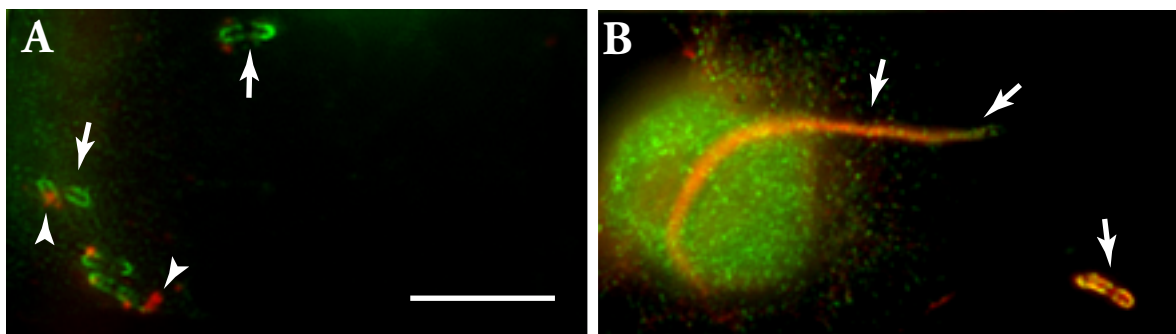
**Tab.9:** Analyse isogener *Listeria actA*-Mutanten in infizierten Zellkulturen.

<b>Listerien- Stamm</b>	<b>ActA</b>	<b>Aktin Akkumulation</b>	<b>p21-Arc Rekrutierung</b>	<b>VASP/Mena Bindung</b>
wt	<sup>146</sup> KKRRK <sub>150</sub>	+	+	+
$\Delta actA3$	$\Delta 128-152$	—	—	+
$\Delta actA5$	$\Delta 263-422$	+	+	—
$\Delta actA10$	<sup>146</sup> KKRKK <sub>150</sub>	—	—	+
$\Delta actA11$	<sup>146</sup> IKRRI <sub>150</sub>	+	+	+

### 3.5 Wirkung von Latrunculin B auf die Motilität von *Listeria monocytogenes*.

Um zu untersuchen ob, die Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes auch unabhängig von Aktinfilamenten stattfindet, wurden infizierte Zellen mit Latrunculin B behandelt, einer Substanz, die aus *Latrunculia magnifica*, einer Schwammart aus dem Roten Meer, isoliert wurde. Latrunculin B inhibiert die Aktin-Polymerisierung, zerstört bestehende Aktinfilamente und hemmt dadurch Mikrofilament abhängige Zellprozesse mit einer 10- bis 100-fach höheren Wirksamkeit als Cytochalasine (Spector *et al.* 1989).

PtK<sub>2</sub>-Zellen wurden mit *Listeria monocytogenes* EGD infiziert. 4 h nach Beginn der Infektion wurde das Kulturmedium mit 12 µM Latrunculin B versetzt, und nach 30 Min. Inkubation wurden die Zellen fixiert und mit Phalloidin und pAk anti-p21-Arc gefärbt (Abb.28).



**Abb.28:** Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von PtK<sub>2</sub>-Zellen nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* EGD und Behandlung mit Latrunculin B.

Die Zellen wurden 4 h nach Beginn der Infektion für 30 Min. mit 12 µM Latrunculin B versetzt und anschließend fixiert (A). Aktin wurde mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin (rot) und p21-Arc mit pAk und FITC-konjugierten Sekundär-Antikörpern (grün) angefärbt. (B) zeigt eine unbehandelte Kontrollzelle. Die Pfeile zeigen p21-Arc auf der Oberfläche und im Aktinschweif der Listerien. Die Pfeilspitzen markieren Reste von zerstörten Aktinfilamenten in der Latrunculin B behandelten Zelle.

(Maßstabsbalken entspricht 5 µm)



## Ergebnisse

---

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, daß das Aktin-Zytoskelett nahezu vollständig zerstört und kein Aktin an intrazellulären Listerien nachzuweisen war (A). Die Rekrutierung von p21-Arc wird durch Latrunculin B jedoch nicht beeinflußt. Die Intensität der p21-Arc-Färbung ist vergleichbar mit der von stationären Bakterien in unbehandelten Zellen (B).

Diese Ergebnisse zeigen, daß der Arp2/3-Komplex auch dann von den intrazellulären Listerien rekrutiert wird, wenn Aktinfilamente depolymerisiert wurden.

## 4 Diskussion

Die intra- und interzelluläre Verbreitung von *Listeria monocytogenes* ist ein wesentliches Merkmal für die Virulenz dieses Krankheitserregers. Die Kraft zur Fortbewegung im Zytoplasma der Wirtszelle wird durch die Polymerisierung von Aktinfilamenten an einem Pol der Bakterienoberfläche erzeugt. Dieselben Mechanismen werden von höheren Zellen eingesetzt, um durch die gezielte Aktin-Polymerisierung eine gerichtete Zellbewegung zu erzielen. Das Verständnis der Motilität von intrazellulären Listerien läßt daher direkte Rückschlüsse auf die Dynamik und die Regulation des Mikrofilamentsystems in höheren Zellen zu.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß mehrerer Proteine des Mikrofilamentsystems auf die Aktin-abhängige Fortbewegung der Listerien mit Hilfe verschiedener Testsysteme untersucht. Mit den dabei verwendeten Methoden des *Listeria-in-vitro*-Motilitätsassays, des Mitochondrien-Targeting-Systems, sowie der Charakterisierung isogener *Listeria*-Mutanten wurden Ansätze gewählt, deren Ergebnisse sich gut auf *in vivo* Bedingungen übertragen lassen.

### 4.1 Proteine der Ena/VASP-Proteinfamilie verstärken die Aktin-Polymerisierung auf der Oberfläche von *Listeria monocytogenes*.

Für VASP und Mena, zwei Vertreter der Ena/VASP-Proteinfamilie, konnte ihre Bindung an das listerielle ActA-Protein nachgewiesen werden (Chakraborty *et al.* 1995; Gertler *et al.* 1996). Dabei fungierte die prolinreiche Repeatregion von ActA als einzige Bindungsdomäne (Pistor *et al.* 1995; Gerstel *et al.* 1996). In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, daß die prolinreiche Repeatregion als GST-ActA<sub>R1-4</sub> mit dem listeriellen ActA um die endogenen Ena/VASP-Proteine kompetitierte, und so die Listerien-Motilität inhibierte. Außerdem konnten isogene *Listeria actA*-Mutanten, bei denen die prolinreiche Repeatregion deletiert wurde, nur noch sehr ineffizient Aktin polymerisieren.

## Diskussion

---

Diese Mutanten konnten sich zwar intrazellulär verbreiten, jedoch waren die Aktinschweife sehr kurz und die Bakteriengeschwindigkeit war um das 4- bis 5,5-fache reduziert (Smith *et al.* 1996; Niebuhr *et al.* 1997). Demnach wirken VASP und Mena als Beschleuniger der Aktin-Polymerisierung auf der Oberfläche intrazellulärer Listerien, und nicht als Faktoren, welche die *de novo* Nukleation von Aktinfilamenten induzieren.

Die erfolgreiche Etablierung von *Listeria-in-vitro*-Motilitätsassays in Extrakten aus *Xenopus* Oozyten (Theriot *et al.* 1994; Marchand *et al.* 1995), Thrombozyten (Carlier *et al.* 1997; Welch *et al.* 1997a) oder Mäusehirnen (May *et al.* 1999) machte es möglich, die Rolle der Ena/VASP-Proteine gezielt *in vivo* zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß sich Listerien in zellfreien Systemen nach nahezu vollständiger Entfernung von VASP aus Thrombozytenextrakten nicht mehr fortbewegten, obwohl sie weiterhin in der Lage waren, Aktin an ihrer Oberfläche zu akkumulieren. Die Motilität der Listerien konnte wiederhergestellt werden, in dem rekombinant exprimiertes VASP den immunodepletierten Extrakten hinzugefügt wurde. Damit wurde erstmals die direkte funktionelle Beteiligung von VASP an der Listerien-Motilität nachgewiesen.

Es war etwas überraschend, daß die Immunodepletion von VASP den völligen Verlust der Listerien-Motilität bewirkte, obwohl bei *actA*-Mutanten mit einer Deletion der VASP-Bindungsdomäne in infizierten Zellen nur eine starke Verringerung der Geschwindigkeit zu messen war. Auch in einem *in-vitro*-Motilitätsassay, bei dem ausschließlich gereinigte Proteine verwendet wurden, waren die Listerien ohne VASP motil. Die Zugabe von VASP bewirkte dann eine fünffache Steigerung der Geschwindigkeit (Loisel *et al.* 1999).

Der Grund ist wahrscheinlich, daß die Effektivität der Aktin-Akkumulation in den zellfreien Extrakten deutlich schlechter war als in intakten Gewebekulturzellen. Während Listerien in infizierten Zellen Geschwindigkeiten von 20-30 µm/Min. erreichten, waren sie in Thrombozytenextrakten 8- bis 10-fach langsamer (Theriot *et al.* 1992; Smith *et al.* 1996; Niebuhr *et al.* 1997).

## Diskussion

---

Mit der Verfügbarkeit von Mena-knockout-Mäusen (Lanier *et al.* 1999) und der Untersuchung daraus hergestellter Hirnextrakte konnte die Rolle von Mena näher untersucht werden. Die Listerien waren in Mena<sup>(-/-)</sup>-Extrakten weiterhin motil. Da im Hirngewebe von Mäusen jedoch Evl nachgewiesen werden konnte (Hauser *et al.* 1999; Aszodi *et al.* 1999), liegt die Vermutung nahe, daß auch Evl an der Aktin-abhängigen Motilität beteiligt sein könnte. Nach der Immunodepletion von Evl aus Mena<sup>(-/-)</sup>-Extrakten war keine Listerien-Motilität mehr zu beobachten. Sie konnte durch rekombinantes Evl oder VASP wieder hergestellt werden.

Diese Studien zeigten, daß die Proteine der Ena/VASP-Familie an der Aktin-vermittelten Bewegung von Listerien direkt beteiligt sind. Zwar war die initiale Aktin-Akkumulation an der Bakterienoberfläche unabhängig von Ena/VASP-Proteinen, jedoch konnte ohne sie keine effektive Polymerisierung zu Aktinfilamenten stattfinden. Die Möglichkeit, daß entweder rekombinantes VASP oder Evl die Motilität in depletierten Extrakten rekonstituieren konnten, demonstrierte, daß VASP, Mena und Evl in dieser Funktion untereinander austauschbar waren. Dies wurde bestätigt durch eine Studie, in der die heterologe Expression von humanem VASP in *Drosophila*-Embryonen eine ansonsten letale Mutation von Ena, dem Analogon von Mena, ausgleichen konnte (Ahern-Djamali *et al.* 1999).

### 4.2 EVH1 und EVH2 sind zwei Proteinmodule mit unterschiedlichen Funktionen.

Der Sequenzvergleich der Primärstrukturen von VASP, Mena, Ena und Evl identifizierte zwei konservierte Regionen, die Ena-VASP-Homologiedomänen EVH1 und EVH2 (Gertler *et al.* 1996). Die Bindung dieser Proteine an ActA wird durch die aminoterminalen EVH1-Domäne vermittelt (Gertler *et al.* 1996; Niebuhr *et al.* 1997; Carl *et al.* 1999). Am Beispiel von Mena wurde gezeigt, daß ein mikroinjiziertes GST-EVH1-Fusionsprotein in fokalen Adhäsionsplaques lokalisiert war und *in vitro* mit Zyxin interagiert (Gertler *et al.* 1996). Außerdem wurde eine Interaktion von VASP mit Vinculin, einem weiteren Protein der fokalen Adhäsionsplaques, nachgewiesen (Brindle *et al.* 1996; Reinhard *et al.* 1996).

## Diskussion

---

Weiterhin waren die EVH1-Domänen von VASP, Mena und Evl als GFP-Fusionsproteine ebenfalls in den fokalen Adhäsionsplaques und an der Oberfläche intrazellulärer Listerien lokalisiert (Carl *et al.* 1999). Die prolinreiche Repeatregion von ActA konnte als EVH1-Bindungsdomäne identifiziert werden (Niebuhr *et al.* 1997; Carl *et al.* 1999).

Die molekulare Analyse der ActA-Repeats ergab, daß sie ein neues prolinreiches Bindungsmotiv definierten, das sich von den bekannten SH3- und WW-Domänen unterschied (Niebuhr *et al.* 1997). Diese EVH1-Bindungsdomäne findet sich auch in Vinculin und Zyxin, zwei Bestandteilen der fokalen Adhäsionsplaques. Eine genauere Analyse des EVH1-Bindungsmotivs (<sup>E</sup>/<sub>D</sub>FPPPPx<sup>D</sup>/<sub>E</sub>) durch den Austausch einzelner Aminosäuren zeigte, daß die zentralen vier Prolin-Reste und die flankierenden sauren Aminosäuren wichtig für die Bindung waren, wobei dem vorangestellten Phenylalanin eine besondere Bedeutung zukam (Niebuhr *et al.* 1997; Carl *et al.* 1999).

Die kürzlich vorgestellten Röntgenstrukturanalysen der EVH1-Domänen von Mena und Evl bestätigten die Bindungsexperimente. Drei Aminosäuren der EVH1-Domäne bilden mit ihren aromatischen Seitenketten eine hydrophobe Tasche, welche die prolinreiche Kernsequenz des Liganden in einer Polyprolin II-Konformation aufnimmt. Diese spezielle Konformation ist eine links-drehende Helix mit drei Aminosäuren pro Umdrehung. Der vorangestellte Phenylalaninrest richtet die Polyprolin II-Helix dann so aus, daß sie sich mit ihrer Spitze in die EVH1-Domäne einpassen kann (Prehoda *et al.* 1999; Fedorov *et al.* 1999).

Eine stark positiv geladene Oberfläche der EVH1-Domäne interagiert zusätzlich mit den flankierenden sauren Aminosäuren des ActA-Peptids, wodurch die außerordentlich hohe Affinität erreicht wird (Carl *et al.* 1999). Es wurden Affinitätskonstanten für die *in vivo* Bindung von EVH1<sub>VASP</sub> an ActA von  $K_d = 0,1 \mu\text{M}$  (Laurent *et al.* 1999), und für die *in vitro* Bindung von EVH1<sub>Mena</sub> an das ActA-Peptid von  $K_d = 5 \mu\text{M}$  vorgeschlagen (Prehoda *et al.* 1999).

Bei der Untersuchung der direkten Bindung von ActA an die Ena/VASP-Proteine zeigte sich, daß komplette VASP-, Mena- oder Evl-Proteine stärker binden als die EVH1-Domänen allein (Carl *et al.* 1999). Die Addition von EVH1-Proteinfragmenten zum Listeria-*in-vitro*-Motilitätsassay bestätigte diese Beobachtungen. Die GST-EVH1-Fusionsproteine mußten mit Listerien vorinkubiert werden, um überhaupt eine hemmende Wirkung auf die Listerien-Motilität auszuüben. Doch innerhalb 30 Minuten

## Diskussion

---

Inkubationszeit begannen sich die Listerien wieder auszubreiten. Wahrscheinlich hat endogenes VASP die EVH1-Proteinfragmente von der Listerienoberfläche verdrängt und konnte anschließend die Aktin-Polymerisierung beschleunigen.

Die höhere Affinität von komplettem VASP zu ActA ließe sich sehr einfach durch eine stabilisierende Wirkung des übrigen Proteinkörpers erklären. Doch eine Reihe von Untersuchungen deutet auf eine Beteiligung der EVH2-Domäne hin.

Verschiedene Studien konnten demonstrieren, daß die EVH2-Domäne zur Multimerisierung fähig ist (Ahern-Djamali *et al.* 1998; Carl *et al.* 1999). Bei VASP konnten z.B. Tetramere detektiert werden (Bachmann *et al.* 1999). Durch diese Tetramerisierung könnte in allen verwendeten Testsystemen jeder EVH1-bindende Ligand bis zu vier Ena/VASP-Moleküle binden. Zum Beispiel würde ActA mit seinen vier EVH1-Bindungsdomänen dadurch eine 16-fache Signalverstärkung erreichen.

Auch die Eigenschaft von VASP, mit Aktinfilamenten zu cosedimentieren (Reinhard *et al.* 1992) konnte auf eine funktionelle Rolle der EVH2-Domäne zurückgeführt werden (Laurent *et al.* 1999; Hüttelmaier *et al.* 1999).

In einer neuen Studie wurden diesen verschiedenen Funktionen der EVH2-Domäne zwei Sequenzabschnitte zugeordnet. Die am äußersten C-terminalen Ende gelegenen 38 Aminosäuren waren zur Oligomerisierung notwendig, die wahrscheinlich durch die Ausbildung von »coiled-coil« Wechselwirkungen zustande kommt. Die N-terminalen 117 Aminosäuren der EVH2-Domäne konnten F-Aktin binden, während die Oligomerisierungsregion dazu nicht in der Lage war (Bachmann *et al.* 1999).

Carlier und Mitarbeiter haben für die Wechselwirkung von VASP mit F-Aktin eine Abhängigkeit vom Phosphorylierungsstatus von VASP festgestellt. Die Phosphorylierung hatte die Affinität zu Aktinfilamenten um das 40-fache gesteigert (Laurent *et al.* 1999). Um die Relevanz dieser Versuchsergebnisse beurteilen zu können, müssen jedoch gezielte Mutagenisierungen der Phosphorylierungsstellen erfolgen und die Proteine in den verschiedenen vorgestellten Testsystemen untersucht werden.

## Diskussion

---

Das Zusammentreffen von Sequenzhomologie und Funktionalität in den definierten Proteinbereichen EVH1 und EVH2 läßt vermuten, daß es sich um konservierte Domänen mit Modulcharakter handelt. Beide Domänen sind innerhalb der Ena/VASP-Proteinfamilie an den extremen Enden lokalisiert, und es wurden für sie, im Gegensatz zur zentralen prolinreichen Region, globuläre Strukturen prognostiziert (Wotton 1994; Haffner *et al.* 1995). Ein modularer Aufbau ist deshalb sehr wahrscheinlich. Solche Bindungmodule werden häufig in Signaltransduktionsproteinen gefunden. Sie bilden kompakte Proteineinheiten, die ihre Faltung auch dann aufrecht erhalten können, wenn sie vom Rest des Moleküls isoliert werden. Meist liegen ihre C- und N-Termini in der räumlichen Struktur dicht beieinander, so daß sie als Modul in die Oberfläche eines Proteins eingebaut werden können. Beispiele sind SH2-, SH3- und PH-Domänen, die auch schon in Zytoskelettproteinen entdeckt wurden (Koch *et al.* 1991; Bar-Sagi *et al.* 1993).

### 4.3 Die Funktion der Ena/VASP-Proteine in höheren Zellen.

Mit Hilfe von *Listeria monocytogenes* als Modellsystem konnten die Proteine der Ena/VASP-Familie als verstärkende Faktoren der Aktin-Polymerisierung identifiziert werden. Die Wirkung dieser Proteine ist wahrscheinlich auf die Rekrutierung von Profilin zurückzuführen. Profilin ist ein kleines (14 kDa), ubiquitär vorkommendes Protein, das an monomeres G-Aktin bindet (Carlsson *et al.* 1977). Weiterhin konnte es an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI-4,5-P<sub>2</sub>), an den Arp2/3-Komplex, VASP, Mena und p140Dia, sowie an poly-L-Prolin binden (Lassing & Lindberg 1985; Tanaka & Shibaka 1985; Machesky *et al.* 1994; Reinhard *et al.* 1995; Gertler *et al.* 1996; Watanabe *et al.* 1997).

Profilin existiert in zwei Isoformen, die in ihrer Aminosäuresequenz nur zu 65% identisch sind (Honoré *et al.* 1993). Ihre Affinitäten zu Aktin waren vergleichbar, jedoch zeigte Profilin I eine größere Affinität zu PI-4,5-P<sub>2</sub>, während Profilin II eine höhere Affinität zu VASP aufwies (Lambrechts *et al.* 1997, Jonckheere *et al.* 1999).

## Diskussion

---

Profilin förderte die Freisetzung von G-Aktin aus dem Thymosin $\beta$ 4-gebundenen Pool der Zelle (Pantaloni & Carlier 1993; Kang *et al.* 1999). Außerdem erhöhte es die Rate des Nukleotidaustausches von ADP durch ATP an G-Aktin (Goldschmidt-Clermont *et al.* 1991). Dadurch katalysierte Profilin die Polymerisierung von Aktinfilamenten (Kang *et al.* 1999). Profilin konnte an die GP<sub>5</sub>-Motive der Ena/VASP-Proteinfamilie binden (Reinhard *et al.* 1995; Kang *et al.* 1997; Jonckheere *et al.* 1999), die wiederum über ihre EVH1-Domäne an Orte mit erhöhter Dynamik der Aktinfilamente dirigiert wurden, wie z.B. in fokale Adhäsionsplaques, in Lamellipodien und Filopodien, sowie in die »growth cones« von Nervenzellen (Reinhard *et al.* 1992; Gertler *et al.* 1996). Es konnte z.B. VASP als GFP-Fusionsprotein in einer Zelllinie mit hoher Motilität an der vordersten Front der Führungslamelle, sowie in den sich proximal entwickelnden fokalen Adhäsionsplaques lokalisiert werden. Durch die quantitative Analyse konnte die Intensität der GFP-VASP Fluoreszenz mit der Vorschubgeschwindigkeit des Lamellipodiums korreliert werden (Rottner *et al.* 1999).

In den fokalen Adhäsionsplaques interagierten die Ena/VASP-Proteine über ihre EVH1-Domäne mit dem FP<sub>4</sub>-Motiv in Zyxin und Vinculin (Brindle *et al.* 1996; Reinhard *et al.* 1996; Gertler *et al.* 1996; Ahern-Djamali *et al.* 1999). Zyxin wurde in motilen Zellen, im Gegensatz zu VASP, nicht in der Front der Führungslamelle gefunden. Es war jedoch zusammen mit Vinculin eine der frühen Komponenten bei der Neuformierung von fokalen Kontakten (Krause 1999). Die Lokalisierung von Mena in den fokalen Adhäsionsplaques ist wahrscheinlich mehr von der Bindung an Zyxin als an Vinculin abhängig. Nach der Delokalisierung von Zyxin aus fokalen Adhäsionsplaques durch Mikroinjektion eines Peptids, war auch in 72% der Zellen Mena delokalisiert, obwohl die Vinculin-Verteilung kaum beeinträchtigt war (Drees *et al.* 1999).

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs des VASP- bzw. Mena-Einbaus in fokale Adhäsionsplaques, z.B. auch simultan mit Zyxin oder Vinculin, würde weitere Erkenntnisse zur Dynamik dieser Strukturen und zur Rolle von VASP/Mena liefern. VASP könnte nach Zyxin und Vinculin eingebaut werden und über die F-Aktin-quervernetzende Wirkung zum Beispiel eine Verbindung zu den Stressfasern herstellen.



## Diskussion

---

Im Gegensatz zu der beschriebenen Verstärkung der Aktindynamik durch VASP stehen die Ergebnisse, die aus der Untersuchung der Thrombozyten-Aktivierung von VASP-Knockout-Mäusen gewonnen wurden.

Die Aktivierung von Thrombozyten durch u.a. Kollagen oder Thrombin führt zu deren Aggregation und damit zur Blutgerinnung. Zur Verhinderung der Bildung von Blutgerinnseln bei Thrombose-gefährdeten Patienten werden Vasodilatoren, wie Prostaglandine oder Nitroglyzerin-Präparate eingesetzt. Diese führen zu einer Erhöhung des cAMP- und cGMP-Spiegels im Körper, wodurch die Aggregation der Thrombozyten reduziert wird (Waldmann *et al.* 1986). Parallel dazu wird das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) durch cAMP- und cGMP-abhängige Kinasen phosphoryliert (Waldmann *et al.* 1987; Halbrügge & Walter 1989; Halbrügge *et al.* 1990).

VASP-Knockout-Mäuse waren äußerlich nicht von wild-typ Mäusen zu unterscheiden. Sie hatten eine normale Lebenserwartung und es konnte keine veränderte Thrombozytenzahl festgestellt werden.

Da der inhibitorische Effekt der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP auf die Thrombozyten-Aggregation jedoch stark reduziert war, wurde daraus geschlossen, daß er in Thrombozyten zumindest teilweise durch VASP vermittelt wird. Besonders auffällig war, daß die Kollagen-induzierte Aggregation von VASP<sup>(-/-)</sup>-Thrombozyten schneller verlief und die Oberflächen-Expression von P-Selectin erhöht war. Die Bindung von Fibrinogen an den Rezeptor Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  war verstärkt, ohne daß die Expression der Integrine verändert war (Aszódi *et al.* 1999; Hauser *et al.* 1999).

Integrine sind Transmembranproteine und ein Hauptbestandteil der fokalen Adhäsionsplaques. Sie binden Bestandteile der extrazellulären Matrix und andere Rezeptoren. Die zytoplasmatische Domäne bindet mehrere Komponenten der fokalen Kontakte, z.B. Talin,  $\alpha$ -Actinin, Shc und die Kinasen »focal adhesion kinase« (FAK) und »integrin linked kinase« (ILK). Dadurch nehmen sie eine Schlüsselstellung bei der »outside-in« und der »inside-out« Signaltransduktion ein (Übersicht bei: Hynes 1992).

## Diskussion

---

Die Lokalisierung von VASP in fokalen Kontakten und die Regulation der VASP-Aktivität durch Kinasen und Phosphatasen läßt vermuten, daß VASP und andere Vertreter der Ena/VASP-Proteinfamilie an der Aktivierung der Integrine beteiligt sind und *in vivo* negative Regulatoren der Thrombozyten-Aggregation darstellen.

Die bisherigen Ausführungen verdeutlichten, daß die Proteine der Ena/VASP-Familie an vielen verschiedenen Zellfunktionen beteiligt sind. In Zukunft werden sicherlich weitere Vertreter dieser Proteinfamilie identifiziert werden.

Da die Ena/VASP-Proteine unter Laborbedingungen, d.h. in Gewebekulturzellen und *in vitro* Versuchen, untereinander austauschbar sind, müssen für das Verständnis ihrer Funktion *in vivo* Doppel-Knock-Out-Mäuse hergestellt werden. Die Etablierung von Gewebekulturzelllinien oder die Untersuchung von Primärzellen aus diesen Knock-Out-Mäusen wird dann zur Aufklärung der Funktion der einzelnen Vertreter der Ena/VASP-Proteinfamilie beitragen.

### 4.4 Funktionelle Analyse der Aktin-Nukleationsdomäne von ActA.

Die detaillierte Analyse der funktionellen Domänen von ActA ist die Voraussetzung, um die Aktin-Polymerisierung durch intrazelluläre Listerien zu verstehen. Die C-terminale Domäne mit dem Membrananker exponiert ActA auf der Oberfläche der Bakterienzelle und durchspannt die vielschichtige Mureinzellwand. Die zentrale prolinreiche Repeatregion konnte Proteine der Ena/VASP-Proteinfamilie binden, welche wiederum die Aktin-Polymerisierung verstärkten. Die gesamte Aktivität der *de novo* Nukleation von Aktinfilamenten ging jedoch von der N-terminalen Domäne aus (Pistor *et al.* 1995; Friederich *et al.* 1995; Lasa *et al.* 1995). Mit Hilfe von N-terminal verkürzten ActA-Molekülen konnte ein kurzer Abschnitt (Aminosäuren 128-153) eingegrenzt werden, der für die Aktivität essentiell war. Diese Aktin-Nukleationsdomäne enthält eine charakteristische Sequenz aus fünf basischen Aminosäureresten (<sub>146</sub>-KKRRK<sub>-150</sub>), die auch im verwandten iActA aus *Listeria ivanovii* konserviert ist (Gröbe 1995; Gerstel *et al.* 1996). Listerien, die ActA mit einer internen Deletion dieser kurzen Sequenz exprimierten, konnten kein Aktin akkumulieren und waren nicht mehr motil (Lasa *et al.* 1997; Pistor *et al.*, eingereicht).

## Diskussion

---

Interne Deletionen können jedoch die Faltung eines Proteins nachhaltig stören, so daß für diese Arbeit Aminosäuren in der Aktin-Nukleationsdomäne gezielt mutiert wurden. Mit Hilfe des Mitochondrien-Targeting-Systems, bei dem das listerielle Protein in eukaryontischen Zellen exprimiert wurde, konnte die Aktivität der mutierten ActA-Proteine untersucht werden.

Die Ergebnisse bestätigten die funktionelle Relevanz der Aktin-Nukleationsdomäne, da nach dem Austausch aller fünf Aminosäuren keine Aktin-Akkumulation an den Mitochondrien zu beobachten war. Die Fähigkeit VASP zu rekrutieren war unbeeinträchtigt. ActA mit Mutationen der Lysin-Reste war weiterhin aktiv, während der konservative Austausch von Arginin-149 zu Lysin zum Verlust der Aktivität führte.

Das Mitochondrien-Targeting-Systems ist eine schnelle Methode um die Aktivität von ActA-Konstrukten zu untersuchen. Es hat jedoch den entscheidenden Nachteil, daß die Mitochondrien keine Polarität der Aktin-Akkumulation ausbilden und somit keine Motilität untersucht werden kann.

Auch komplementierte  $\Delta actA$ -Mutanten, d.h. Listerien mit einer Deletion des gesamten *actA*-Gens, die mit einem Plasmid-codierten *actA*-Konstrukt komplementiert wurden, waren ungeeignet, da sie bereits stark reduzierte Infektionsraten aufwiesen und weniger als 1% der intrazellulären Bakterien in der Lage war, Aktinschweife auszubilden.

Um die Auswirkungen von ActA-Mutationen unter möglichst natürlichen Bedingungen zu untersuchen, wurden daher isogene Listeria-Mutanten hergestellt. Dabei wurde das chromosomale *actA*-Gen mutiert, so daß Zeitpunkt und Stärke der ActA-Expression exakt wie bei wild-typ Listerien reguliert waren.

Die Untersuchung der mutierten Listeria-Stämme  $\Delta actA10$  und  $\Delta actA11$  nach Infektion von Gewebekulturzellen bestätigte die Ergebnisse aus dem Mitochondrien-Targeting-System. Nach der Mutation der flankierenden Lysin-Reste des basischen Pentamers ( $\Delta actA11$ ; <sub>146</sub>-IKRRI-<sub>150</sub>) war hinsichtlich Motilität und Formierung von Aktinschweiften, kein Unterschied zu wild-typ Listerien festzustellen, während die Mutation eines Arginin-Restes ( $\Delta actA10$ ; <sub>146</sub>-KKRKK-<sub>150</sub>) zum Verlust der Aktin-Rekrutierung und der Motilität führte, und diese Bakterien als Mikrokolonien wuchsen. Auch Mutanten mit dem

## Diskussion

---

Austausch des zweiten Arginin-Restes ( $\Delta actA14$ ;  $_{146}\text{-KKSRK}_{-150}$ ) waren nicht mehr motil (Pistor *et al.*, eingereicht). Es konnten also die zwei Arginin-Reste in der Aktin-Nukleationsdomäne von ActA als essentiell für die Aktin-Akkumulation von intrazellulären Listerien identifiziert werden.

Mit dem Arp2/3-Komplex wurde eine weitere zelluläre Komponente identifiziert, die an der Aktin-Polymerisierung von Listerien beteiligt war. Aus humanen Thrombozyten gereinigter Arp2/3-Komplex konnte die Aktin-Akkumulation von *Listeria monocytogenes* in einem zellfreien Systemen initiieren (Welch *et al.* 1997a). Die dabei beschriebene Aktin-Wolke um die Listerien hatte große Ähnlichkeit mit den Strukturen, die nach der Immunodepletion von VASP beobachtet wurden.

Der Arp2/3-Komplex ist ein ubiquitär verbreiteter Proteinkomplex aus sieben Untereinheiten, den »actin related proteins« Arp 2 und Arp 3, sowie fünf weiteren Proteinen die keine Homologie mit bekannten Proteinen aufweisen. Er wurde ursprünglich in *Acanthamoeba* identifiziert (Machesky *et al.* 1994), und seitdem auch in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Dictyostelium discoideum* und in humanen Thrombozyten und Neutrophilen nachgewiesen (Übersicht bei: Machesky & Gould 1999).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Antikörper gegen rekombinantes humanes p21-Arc konnten diese Untereinheit des Arp2/3-Komplexes an der Oberfläche stationärer Listerien und im Aktinschweif motiler Listerien nachweisen. Polyklonale Antikörper, die gegen Peptide von p34-Arc und Arp 3 gerichtet waren, zeigten dieselbe Lokalisierung, und auch in transfizierten Zellen, welche ein GFP-Arp 3-Fusionsprotein exprimieren, war GFP-Arp 3 in den Aktinschweif hinter intrazellulären Listerien nachweisbar (Welch *et al.* 1997a,b).

Die Lokalisierung des Arp2/3-Komplexes an Listerien ist von ActA abhängig. An Listerien-Stämmen mit einer Deletion der prolinreichen Repeatregion ( $\Delta actA5$ ) war p21-Arc nachweisbar. Stämme mit einer Deletion der gesamten Aktin-Nukleationsdomäne ( $\Delta actA3$ ) oder mit Mutationen in dieser Domäne ( $\Delta actA10$  und  $\Delta actA14$ ) konnten kein p21-Arc mehr rekrutieren. Dies bedeutete, daß die Arginin-Aminosäuren an Position 148 und 149 nicht nur für die Aktin-Akkumulation, sondern auch für die Rekrutierung von p21-Arc und dem Arp2/3-Komplex essentiell sind.

## Diskussion

---

Der Arp2/3-Komplex ist aber nicht wie viele andere Zytoskelettproteine nur mit den Aktinfilamenten assoziiert, da die p21-Arc Untereinheit auch an Listerien nachzuweisen war, nachdem das gesamte F-Aktin der Zelle mit Latrunculin B depolymerisiert wurde. Dies zeigte, daß der Arp2/3-Komplex wahrscheinlich direkt von den Listerien rekrutiert wird.

Eindeutige Beweise für eine direkte Interaktion von ActA und Arp2/3-Komplex konnten jedoch noch nicht geliefert werden. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß an einer Wechselwirkung mehrere Untereinheiten beteiligt sein müssen. Kürzlich wurde in *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt, daß für eine Interaktion von Bee1p/Las17p mit dem Arp2/3-Komplex die p15-Arc und die p19-Arc Untereinheit (entsprechen den humanen p16- bzw. p20-Arc) notwendig waren (Winter *et al.* 1999). Eine weitere Möglichkeit ist, daß ActA innerhalb der Wirtszelle modifiziert wird. Es ist zum Beispiel seit langem bekannt, daß ActA phosphoryliert wird (Brundage *et al.* 1993). Ein erster Ansatz zur Klärung dieser Frage wurde in dieser Arbeit vorgestellt. Es konnte demonstriert werden, daß eine Mutation des Serin-Restes an Position 155 von ActA keine Auswirkung auf die ActA-Aktivität hatte. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß mehrere Phosphorylierungsstellen in ActA existieren. Daher ist es wichtig diese zu identifizieren und entsprechende Punktmutationen zu untersuchen.

Die verwandten Proteine ActA aus *Listeria monocytogenes* und iActA aus *Listeria ivanovii* zeigen Sequenzhomologien nicht nur in der prolinreichen Repeatregion und der Aktin-Nukleationsdomäne, sondern auch in einer weiteren Region des N-Terminus. Diese Region (Aminosäuren 70-85) wurde als Aktin-Bindungsdomäne postuliert, da synthetische Peptide mit der entsprechenden Sequenz die *in vitro* Polymerisierung von Aktin inhibierten, und mit G-Aktin co-polymerisieren konnten (Lasa *et al.* 1997). Ein Kontrollversuch mit einem Peptid gleicher Aminosäurezusammensetzung, aber zufälliger Reihenfolge wurde leider nicht durchgeführt. Weiterhin konnten Beads mit immobilisierten ActA-Proteinfragmenten dieser Region Fluoreszenz-markiertes G-Aktin binden (Cichetti *et al.* 1999). Die Affinität von ActA zu G-Aktin war allerdings so gering, daß schon einfaches Waschen der Beads zum Verlust der Aktinbindung führte.

## Diskussion

---

Listerien mit einer Deletion dieser ActA-Region zeigten in zellfreien Systemen eine »diskontinuierliche Motilität«, d.h. während der Fortbewegung traten kurze stationäre Phasen auf (Lasa *et al.* 1997). Andererseits waren entsprechende isogene Mutanten in infizierten Zellen in ihrer Motilität unbeeinträchtigt (Pistor *et al.*, eingereicht). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß die Aktin-Bindung eine unspezifische Wechselwirkung zwischen dem sauren G-Aktin und dem positiv geladenen ActA-Peptid darstellt.

Mit den Phosphatidylinositolphosphaten PI-3P, PI-3,4-P<sub>2</sub> und PI-3,4,5-P<sub>3</sub> konnten ActA-Liganden identifiziert werden, die keine Proteine waren. Sie banden an den N-Terminus von ActA (Aminosäuren 213-231) in einem Bereich der zwischen der Aktin-Nukleationsdomäne und der prolinreichen Repeatregion liegt (Cichetti *et al.* 1999). Jedoch ist diese Wechselwirkung für die Aktin-Akkumulation durch Listerien ohne Relevanz, da in dieser Arbeit demonstriert wurde, daß ActA-Konstrukte mit Deletionen in diesem Bereich (p42;  $\Delta$ 163-195 und p43;  $\Delta$ 163-238) keine Beeinträchtigungen der Aktin-Akkumulation aufwiesen, und außerdem entsprechende Listerien in *Xenopus*-Extrakten weiterhin motil waren (Lasa *et al.* 1999). Allerdings scheint ActA auch an der Invasion nicht-phagozytierender Zellen beteiligt zu sein (Lasa *et al.* 1998). Da dabei die PI3-Kinase p85-p110 aktiviert wurde (Ireton *et al.* 1996), könnte die Wechselwirkung mit Phosphatidylinositol-phosphaten an der Invasion oder der Ausbreitung von Zelle zu Zelle beteiligt sein.

### 4.5 Nukleation von Aktinfilamenten durch den Arp2/3-Komplex.

In allen untersuchten Organismen wurde der Arp2/3-Komplex in Zellregionen mit hoher Aktin-Dynamik lokalisiert, wie z.B. Lamellipodien und Filopodien, nicht jedoch in Stressfasern. Mutationen von Arp2 und Arp3 in Hefen erzeugen Defekte in der Zytokinese und der Endozytose, und sind letal (Übersicht bei: Machesky 1997).

Basierend auf der Röntgenstruktur von Aktin konnte die Modellierung der 3D-Struktur von Arp 2 und Arp 3 demonstrieren, daß die Sequenzinsertionen als Schleifen auf der Moleküloberfläche liegen könnten. Einige bekannte Bindungsmotive von Aktin wären bei

## Diskussion

---

Arp 2 und Arp 3 zerstört, während andere (z.B. für Profilin) erhalten blieben. Vor allem wäre die Bildung eines Arp 2-Arp 3-Heterodimers, ähnlich einem Aktin-Dimer, sehr wahrscheinlich. Es wurde daher vermutet, daß der Arp2/3-Komplex an der Nukleation von Aktinfilamenten beteiligt sein könnte (Kelleher *et al.* 1995).

*In vitro* konnten verschiedene Wechselwirkungen zwischen dem Arp2/3-Komplex und Aktin nachgewiesen werden. Die langsam wachsenden (-)-Enden von F-Aktin wurden mit hoher Affinität »gecapped«. Der Arp2/3-Komplex konnte an bestehende Aktinfilamente binden und führte zur Quervernetzung und Bündelung von F-Aktin. Die wichtigste Eigenschaft war jedoch, daß der Arp2/3-Komplex die Aktin-Polymerisierung förderte, in dem er die Nukleation von neuen Aktinfilamenten induzierte (Mullins *et al.* 1997 & 1998a,b). Aus der kinetischen Modellierung des Reaktionsverlaufs folgerten die Autoren, daß der Arp2/3-Komplex bevorzugt Aktin-Dimere bindet, diese stabilisiert, und sie dann als Nukleus für die Polymerisierung von neuen Aktinfilamenten zur Verfügung stehen. Die These stützte sich vor allem auf die Beobachtung, daß die bei spontaner Aktin-Polymerisierung *in vitro* meßbare Verzögerung zu Beginn der Reaktion (»lag-Phase«) durch den Arp2/3-Komplex nur geringfügig verkürzt war.

Das ActA-Protein von *Listeria monocytogenes* wirkte stimulierend auf die Nukleationsaktivität des Arp2/3-Komplexes. Die Rate der Aktin-Polymerisierung konnte um das 50-fache gesteigert werden. Besonders auffällig war, daß ActA die »lag-Phase« drastisch verkürzte (Welch *et al.* 1998). Dies ließ vermuten, daß die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch ActA den Mechanismus der Nukleation veränderte. Aktivierter Arp2/3-Komplex könnte den Reaktionsgeschwindigkeits-limitierenden Schritt der Formierung von Aktin-Dimeren umgehen und Filamente direkt aus G-Aktin polymerisieren (Zigmond 1998).

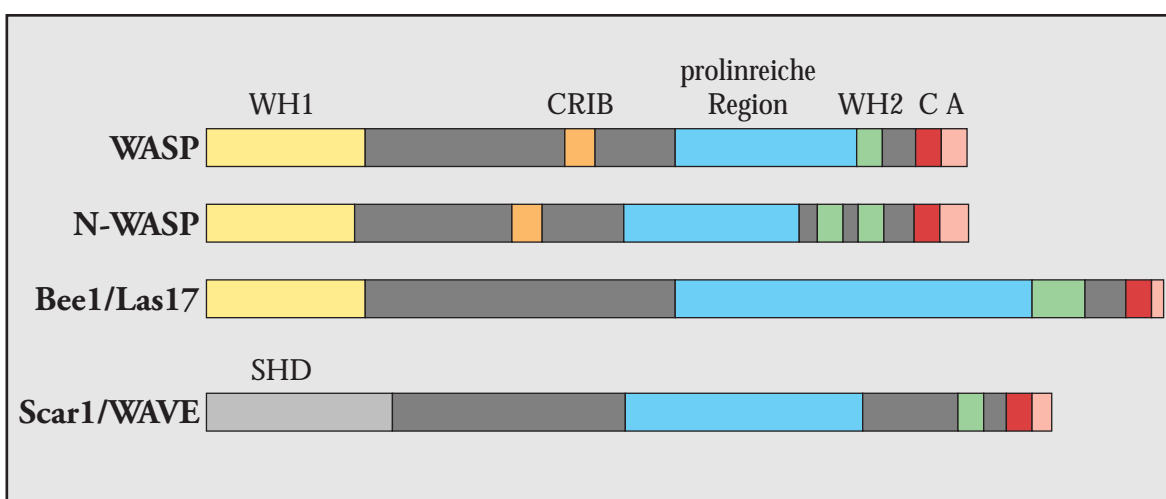
Die Nukleationsaktivität des Arp2/3-Komplexes wurde ebenfalls durch das zelluläre WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) stimuliert. Defekte im WASP führen zum Wiskott-Aldrich Syndrom (Derry *et al.* 1994), einer Krankheit die durch Immunschwäche, das Auftreten von Ekzemen und einem Mangel an Blutplättchen (Thrombopenie) charakterisiert ist. Die Immunschwäche ist auf Fehlfunktionen bei der T- und B-Lymphozyten Aktivierung, sowie das Fehlen einer Immunreaktion gegen Polysaccharid-

## Diskussion

Antigene zurückzuführen. Die Thrombopenie beruht auf morphologischen Veränderungen und erhöhtem Abbau der Thrombozyten von Wiskott-Aldrich-Syndrom-Patienten (Übersicht bei: Abo 1998).

WASP wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, während das verwandte N-WASP ubiquitär vorkommt (Miki *et al.* 1996). Weitere Verwandte sind das homologe Hefeprotein Bee1p/Las17p (Li 1997) und das weniger homologe Scar/WAVE (Bear *et al.* 1998; Miki *et al.* 1998). Alle bekannten Vertreter der WASP-Proteinfamilie waren in der Lage, den Arp2/3-Komplex zu aktivieren (Machesky *et al.* 1999; Rohatgi *et al.* 1999; Winter *et al.* 1999; Yazar *et al.* 1999).

Die Proteine der WASP-Familie zeigen eine gemeinsame modulare Domänenstruktur (Abb. 29), die sie für Signaltransduktionsvorgänge prädestiniert.



**Abb. 29:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Proteine der WASP-Familie. WH1/2= WASP Homologie Domäne 1/2; CRIB= Cdc42/ Rac interactive binding Domäne; CA= Cofilin Homologie and Acidic Domäne; SHD= Scar Homologie Domäne.

Den N-Terminus bildet die WH1-Domäne (WASP homology). Sie besteht aus den sich überlappenden PH- und EVH1- Domänen (Pleckstrin homology; Ena/VASP homology). Es wurden PI-4,5-P<sub>2</sub> und WIP (WASP interacting protein) als Liganden identifiziert (Ramesh *et al.* 1997; Imai *et al.* 1999). Die Scar/WAVE-Unterfamilie ist im N-terminalen Bereich von den WASP-Proteinen verschieden und definiert eine eigene Scar-Homologie-Domäne (SHD).



## Diskussion

---

Der WH1-Domäne schließt sich die CRIB-Domäne an (Cdc 42- Rac interactive binding), welche die kleinen GTPasen Cdc42 und, deutlich schwächer, Rac bindet (Burbelo *et al.* 1995; Aspenström *et al.* 1996; Symons *et al.* 1996). Die CRIB-Domäne fehlt beim Hefeprotein Bee1p/Las17p.

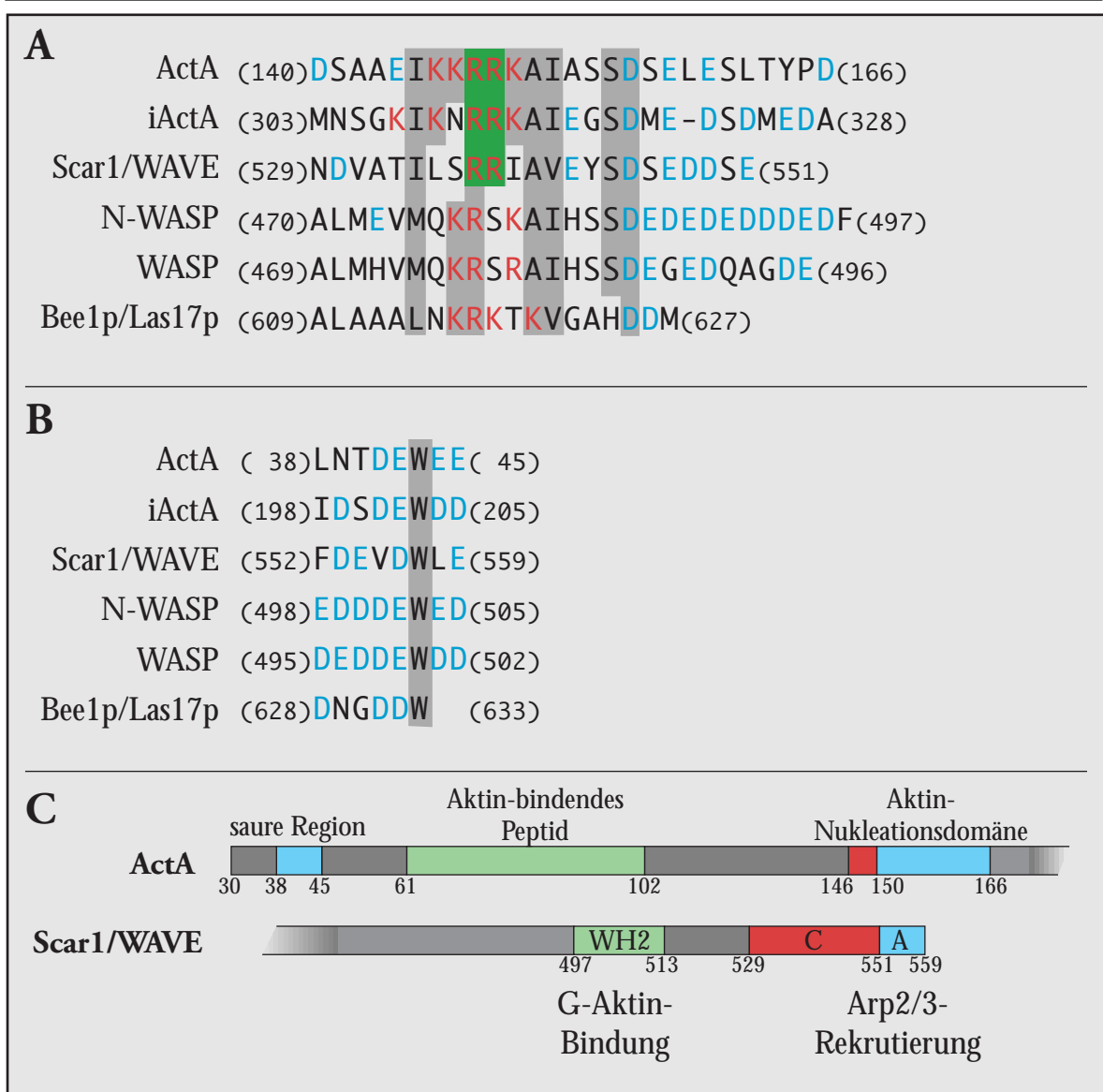
Es folgt eine prolinreiche Region, die einerseits Profilin (Suetsugo *et al.* 1998), andererseits die SH3-Domänen (Src homology) einer Vielzahl von Kinasen (Fgr, Btk, Ctk, Abl) und Adapterproteinen (Ash/Grb, Nck, Fyn, PLC $\gamma_{p85}$ , PSTPIP) binden kann (Rivero-Lozano *et al.* 1995; Banin *et al.* 1996; Bunnell *et al.* 1996; Finan *et al.* 1996; Wu *et al.* 1998).

Im C-Terminus der WASP-Proteine liegen zwei konservierte Regionen. Die WH2-Domäne zeigt Sequenzhomologien zu dem Aktin-bindenden Motiv von Verprolin und kann G-Aktin binden (Symons *et al.* 1996; Machesky & Insall 1998; Miki & Takenawa 1998). Das Carboxy-Ende bildet die CA-Domäne (Cofilin homology and acidic) mit einem basischen ADF/Cofilin homologen Sequenzmotiv und einer Reihe von sauren Aminosäureresten (siehe Abb. 30).

Die detaillierte Analyse der Interaktion von Scar/WAVE mit dem Arp2/3-Komplex ergab, daß die CA-Domäne den Komplex bindet. In einem Hefe-zwei-Hybrid System konnte die direkt Interaktion mit der p21-Arc Untereinheit nachgewiesen werden. Zur Stimulierung der Nukleationsaktivität des Arp2/3-Komplexes waren jedoch entweder gesamtes Protein, oder mindestens die Domänen WH2 und CA gemeinsam notwendig (Machesky & Insall 1998; Machesky *et al.* 1999).

Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen dieser Proteine fällt auf, daß die CA-Domäne von WASP und Scar/WAVE Ähnlichkeiten zu ActA aufweist. Die basische C-Domäne zeigt begrenzte Homologie zur Aktin-Nukleationsdomäne von ActA (Abb. 30A) und die saure A-Domäne ist homolog zu einer Region am N-Terminus des reifen ActA (Abb. 30B). Besonders auffällig ist die Konservierung des Arginin-Paares zwischen ActA und Scar/WAVE. Proteinfragmente von Scar, welche die CA-Domäne enthielten, konnten die Listeria-Motilität und Ausbildung von Aktinschweiften in zellfreien Systemen und transfizierten Zellen blockieren (May *et al.* 1999). Dieselbe Domäne wurde als Bindungspartner der Arp2/3-Komplex Untereinheit p21-Arc identifiziert (Machesky & Insall 1998).

## Diskussion



**Abb.30:** Homologie zwischen ActA und der WASP-Proteinfamilie.

(A) zeigt die Sequenzhomologie zwischen der Aktin-Nukleationsdomäne von ActA und der C-Domäne von Scar1, WASP, N-WASP und Bee1p. (B) zeigt eine zweite N-terminale Domäne von ActA mit Homologie zur sauren A-Domäne der WASP-Proteine. Konservierte Aminosäuren sind grau, die zwei essentiellen Arginin-Reste von ActA und die in Scar1/WAVE konservierten Arginine sind grün unterlegt. Basische Aminosäuren wurden rot und saure Aminosäuren blau dargestellt. (C) zeigt die ähnliche Anordnung der funktionellen Domänen von ActA und Scar1/WAVE.

Abb. 30 C veranschaulicht die ähnliche Domänenstruktur der N-terminalen Region von ActA und des C-Terminus von Scar/WAVE. Es ist daher anzunehmen, daß Scar/WAVE das analoge zelluläre Protein zur Aktin-Nukleationsdomäne von ActA darstellt.

### 4.6 Die Aktin-Akkumulation an der Oberfläche von Listerien

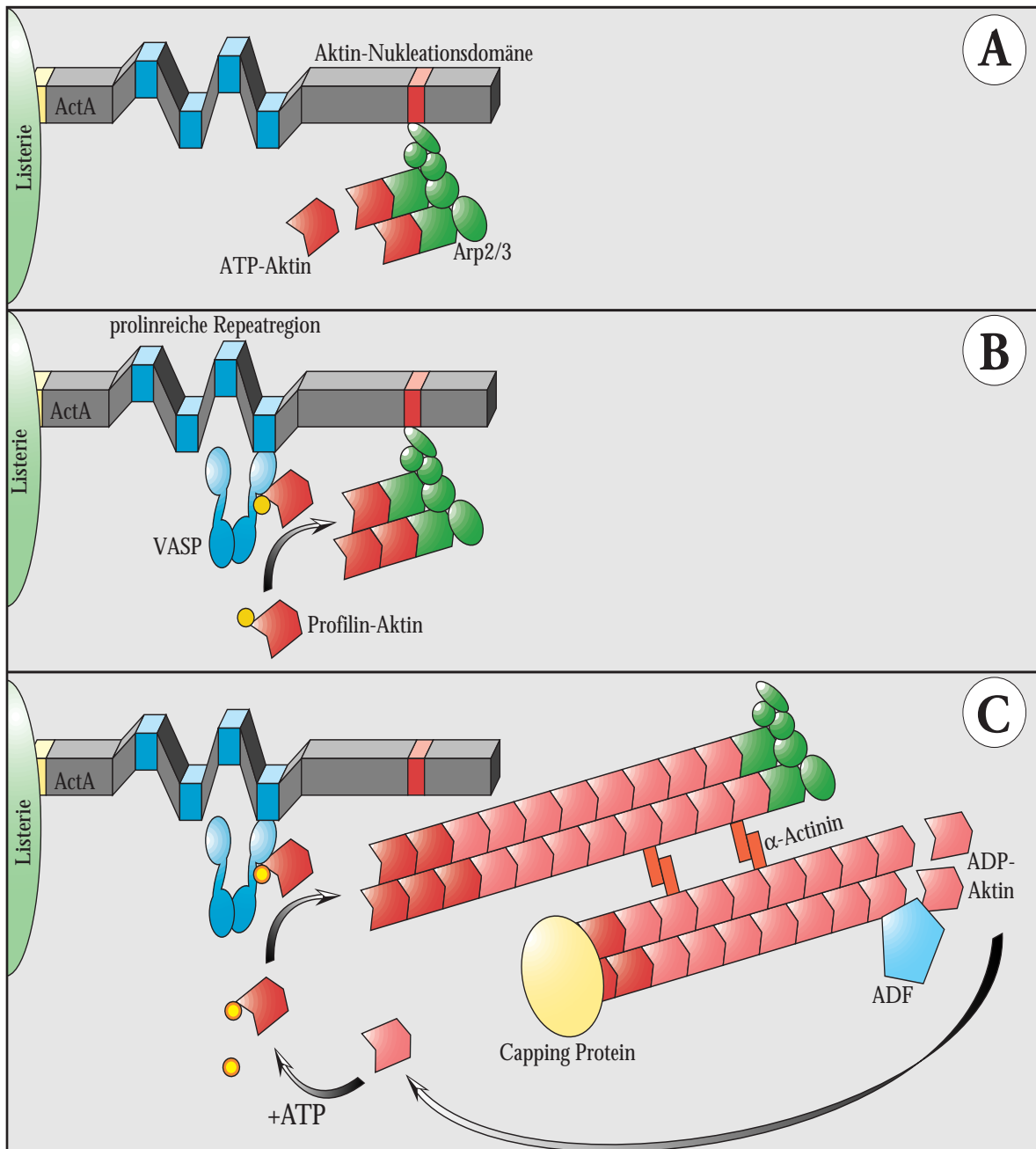
Die Rekonstitution der Motilität von Listerien mit gereinigten Proteinen konnte neben den bekannten Faktoren (Ena/VASP-Proteine und Arp2/3-Komplex) weitere essentielle Proteine identifizieren. Es wurde demonstriert, daß für eine geringe Motilität neben dem Arp2/3-Komplex auch ADF und »Capping Protein« absolut notwendig waren (Loisel *et al.* 1999). ADF (»actin depolymerizing factor«) bildet mit Cofilin und Destrin eine Proteinfamilie, deren Vertreter Aktinfilamente zerschneiden und vom (-)-Ende her depolymerisieren (Übersicht bei: Moon & Drubin 1995; Bamburg *et al.* 1999). »Capping Protein« bindet an das (+)-Ende von Filamenten und verhindert dadurch die weitere Anlagerung von G-Aktin (Übersicht bei: Schafer & Cooper 1995; Carlier 1998).

Damit die Listerien jedoch eine effektive Aktin-Polymerisierung, und damit hohe Geschwindigkeiten erreichten, mußten VASP und Profilin zugegeben werden. Und für eine Stabilisierung des Aktinschweifes war  $\alpha$ -Actinin unerläßlich (Loisel *et al.* 1999).

Nach Veröffentlichung dieser Studie war es möglich eine Modelvorstellung zu entwickeln, wie sie in Abb. 31 schematisch dargestellt ist. Der Mechanismus der Aktin-Polymerisierung durch Listerien läßt sich in drei Abschnitte unterteilen.

- (A) Die Rekrutierung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch die Aktin-Nukleationsdomäne von ActA führt zur *de novo* Nukleation von Aktinfilamenten.
- (B) Durch die Bindung von VASP an die prolinreiche Repeatregion, und die anschließende Rekrutierung von Profilin-Aktin, wird an der Bakterienoberfläche eine lokal erhöhte Aktinkonzentration erzielt. Dadurch können sich die neu gebildeten Aktinfilamente spontan verlängern. Dieser Einbau von Aktin-Molekülen bewirkt die gerichtete Fortbewegung der Listerien.
- (C) An die (+)-Enden von Filamenten, die weit von der Listerienoberfläche entfernt sind, bindet »Capping Protein« und unterbindet dadurch »unnötige« Polymerisierung. Gleichzeitig werden die Filamente durch  $\alpha$ -Actinin und andere quervernetzende Proteine stabilisiert. Vom (-)-Ende her depolymerisiert ADF die Filamente und sorgt so für eine Regenerierung des Pools an G-Aktin und Arp2/3-Komplex. Profilin bindet G-Aktin,

## Diskussion



**Abb.31:** Modelvorstellung für die Aktin-Akkumulation an der Oberfläche von *Listeria monocytogenes*.  
**A:** Nukleation neuer Aktinfilamente durch den Arp2/3-Komplex.  
**B:** Effektive Polymerisierung mit Hilfe der Ena/VASP-Proteine und Profilin.  
**C:** Kontinuierliche Aktin-Polymerisierung durch »Treadmilling«.  
 Weitere Erklärungen sind im Text beschrieben.

fördert den Nukleotidaustausch von ADP durch ATP und führt polymerisationsfähiges Aktin über die Bindung an VASP an die Listerienoberfläche zurück.

Dieser Abschnitt C entspricht dem Tretmühl-Mechanismus, wie er in migrierenden Zellen in Lamellipodien und Filopodien eingesetzt wird. Er führt zur Aufrechterhaltung einer lokal hohen Gleichgewichtskonzentration der beteiligten Faktoren.

### 4.7 Der Umweg von *Shigella flexneri*.

Wie Listerien ist auch ein weiteres intrazelluläres Bakterium, *Shigella flexneri*, in der Lage Aktinschweife zu induzieren und sich innerhalb der Wirtszelle zu verbreiten. Das dafür notwendige Protein IcsA (bzw. VirG) zeigte jedoch keine Homologie zu ActA (Bernardini *et al.* 1989; Lett *et al.* 1989).

Im Aktinschweif von *Shigella* wurde VASP nachgewiesen. Eine direkte Bindung von VASP an IcsA konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Chakraborty *et al.* 1995). Aber IcsA bindet Vinculin (Suzuki *et al.* 1996), und es ist möglich, daß Vinculin über sein FP<sub>4</sub>-Motiv VASP rekrutiert. Da intrazelluläre Shigellen nach Mikroinjektion eines ActA-Peptids der VASP-Bindungsdomäne nicht mehr motil waren, vermuteten die Autoren, daß Shigellen denselben Mechanismus ausnutzen wie Listerien (Laine *et al.* 1997). Allerdings konnte später gezeigt werden, daß Shigellen weiterhin motil waren, wenn die Wirtszelle kein Vinculin exprimiert (Goldberg 1997), oder wenn in zellfreien Systemen weder Vinculin noch VASP vorhanden waren (Loisel *et al.* 1999).

Mit N-WASP konnte ein weiteres zelluläres Protein als Ligand von IcsA identifiziert werden (Suzuki *et al.* 1998). IcsA aktivierte N-WASP, welches in der Folge den Arp2/3-Komplex rekrutieren und so die Polymerisierung von Aktinfilamenten induzieren könnte (Egile *et al.* 1999).

Die Mechanismen der Aktin-Akkumulation von Listerien und Shigellen sind sehr ähnlich. Beide Pathogene nutzen mit dem Arp2/3-Komplex und VASP dieselben Zielfaktoren. Während Shigellen jeweils die zellulären Regulationsproteine rekrutieren, bedient sich *Listeria* nur der funktionellen Domänen dieser Zellproteine und kombiniert sie in seinem Virulenzfaktor ActA.

## Diskussion

---

Andere intrazelluläre Pathogene, wie z.B. das Vaccinia-Virus umgehen die Regulation der Aktin-Polymerisierung, in dem sie ein Protein exprimieren, welches Tyrosin-phosphoryliert wird und dadurch zelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert, welche zur Aktin-Polymerisierung führen (Frischknecht *et al.* 1999a,b).

### 4.8 Ausblick

Die wesentlichen Proteine, welche an der Aktin-vermittelten Bewegung von *Listeria monocytogenes* beteiligt sind, wurden identifiziert. Nun gilt es, die Wechselwirkungen dieser Proteine miteinander zu untersuchen. Insbesondere muß geklärt werden, ob der Arp2/3-Komplex direkt an ActA bindet. Die vorgestellten Antikörper gegen die p21-Arc Untereinheit sind wichtige Werkzeuge, um den Arp2/3-Komplex in Co-Präzipitationsversuchen oder Bindungsassays nachzuweisen. Aus den mutanten *Listeria*-Stämmen gereinigtes ActA-Protein ist ideal als Kontrolle einzusetzen.

Weiterhin ungeklärt ist, inwieweit die Aktin-Bindung oder die Phosphorylierung von VASP die Listerien-Motilität beeinflussen. Die Untersuchung entsprechend mutierter Proteine in VASP-depletiertem Thrombozytenextrakt stellt eine gute Ergänzung zu etablierten *in vitro* Versuchen dar.

Wenn die Regulation der Aktin-Polymerisierung durch Listerien in Zukunft detailliert verstanden ist, wird es vielleicht möglich sein spezifische Therapeutika gegen diese Pathogene zu entwickeln.

## 5 Zusammenfassung

Die humanpathogenen Bakterien der Art *Listeria monocytogenes* greifen mit Hilfe des Oberflächenproteins ActA in die Fortbewegungsmaschinerie der Wirtszelle ein. Sie reorganisieren das Aktinfilamentsystem und nutzen die Aktin-Polymerisierung als treibende Kraft für ihre intrazelluläre Verbreitung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Wirtszellproteine VASP und Arp2/3-Komplex bei der Aktin-Akkumulation durch Listerien untersucht. Ferner wurde die Aktin-Nukleationsdomäne von ActA durch Mutationsanalyse charakterisiert.

1. Die Immunodepletion von VASP aus Thrombozytenextrakten konnte erstmals die direkte Beteiligung von VASP an der Aktin-Akkumulation von *Listeria monocytogenes* demonstrieren.
2. Isolierte GST-EVH1-Proteine kompetitieren mit VASP und inhibieren die Listerien-Motilität. Ihre Affinität zu ActA ist jedoch geringer als die von komplettem VASP, da sie nach einiger Zeit verdrängt werden.
3. Zwei Arginin-Aminosäuren an Position 148 und 149 in der Aktin-Nukleationsdomäne wurden als essentiell für die Aktivität von ActA identifiziert. Die flankierenden Lysin-Reste, oder ein benachbartes Serin sind für die Aktivität ohne Bedeutung.
4. Deletionen zwischen der Aktin-Nukleationsdomäne und der prolinreichen Repeatregion konnten demonstrieren, daß in diesem Bereich keine weitere funktionelle Domäne vorliegt, die an der Aktin-Akkumulation beteiligt ist.

5. Es wurden monoklonale und polyklonale Antikörper gegen die p21-Arc Untereinheit des Arp2/3-Komplexes hergestellt, und im Western-Blot und in der Immunfluoreszenzmikroskopie charakterisiert.
6. Die Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes an die Oberfläche intrazellulärer Listerien ist von der Aktin-Nukleationsdomäne, und nicht von der prolinreichen Repeatregion abhängig. Das Arginin-Paar (Position 148 und 149) ist für die Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes essentiell.
7. Die Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes ist unabhängig von Aktinfilamenten. Die p21-Arc Untereinheit kann unverändert an der Listerien-Oberfläche nachgewiesen werden, nachdem die Aktinfilamente zerstört wurden.

Die erzielten Resultate lieferten nicht nur wichtige Einblicke in die Interaktion von *Listeria monocytogenes* mit dem Mikrofilamentsystem der Wirtszelle, sondern führten auch zum besseren Verständnis der Dynamik und der Regulation der Aktin-Polymerisierung von höheren Zellen.



## 6 Literaturverzeichnis

- ABEL K., LINGNAU A., NIEBUHR K., WEHLAND J. AND WALTER U. (1996)  
Monoclonal antibodies against the focal adhesion protein VASP revealing epitopes involved in the interaction with two VASP binding proteins and VASP phopsphorylation.  
Eur. J. Cell Biol. 69; 39
- ABO A. (1998)  
Understanding the molecular basis of Wiskott-Aldrich syndrome.  
Cell. Mol. Life Sci. 54; 1145-1153
- AHERN-DJAMALI S.M., COMER A.R., BACHMANN C., KASTENMEIER A.S., REDDY S.K., BECKERLE M.C., WALTER U. AND HOFFMANN F.M. (1998)  
Mutations in Drosophila Enabled and rescue by human vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) indicate important functional roles for Ena/VASP homology domain 1 (EVH1) and EVH2 domains.  
Mol. Biol. Cell 9; 2157-2171
- AHERN-DJAMALI S.M., BACHMANN C., HUA P., REDDY S., KASTENMAEIER A.S., WALTER U. AND HOFFMANN F.M. (1999)  
Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for Drosophila Enabled.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 96; 4977-4982
- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFT M., ROBERTS K. AND WATSON J.P. (1991)  
Molekularbiologie der Zelle. 2. Auflage; VCH Weinheim.
- ALVAREZ-DOMINGUEZ C., VAZQUEZ-BOLAND J.A., CARRASCO-MARIN E., LOPEZ-MATO P. AND LEYVA-COBIAN F. (1997)  
Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition.  
Infect. Immun. 65; 78-88
- ARTELT P., MORELLE C., AUSMEIER M., FITZEK M. AND HAUSER H. (1988)  
Vectors for efficient expression in mammalian fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection.  
Gene 68; 213-219
- ASPENSTRÖM P., LINDBERG U. AND HALL A. (1996)  
Two GTPases, CDC42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome.  
Curr. Biol. 6; 70-75
- ASZÓDI A., PFEIFER A., AHMAD M., GLAUNER M., ZHOU X.-H., NY L., ANDERSSON K.-E., KEHREL B., OFFERMANN S. AND FÄSSLER R. (1999)  
The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function.  
EMBO J. 18; 37-48
- BACHMANN C., FISCHER L., WALTER U. AND REINHARD M. (1999)  
The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation.  
J.Biol. Chem. 274; 23549-23557

## Literaturverzeichnis

---

- BAMBURG J.R., MCGOUGH A. AND ONO S. (1999)  
Putting a new twist on actin: ADF/Cofilin modulate actin dynamics.  
Trends Cell Biol. 9; 364-370
- BANIN S., TRUONG O., KATZ D.R., WATERFIELD M.D., BRICKELL P.M. AND GOUT I. (1996)  
Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is a binding partner for c-Src family protein-tyrosine kinases.  
Curr. Biol. 6; 981-988
- BAR-SAGI D., ROTIN D., BATZER A., MANDIYAN V. AND SCHLESSINGER J. (1993)  
SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules.  
Cell 74; 83-91
- BEAR J.E., RAWLS J.F. AND SAXE III C.L. (1998)  
SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late *Dictyostelium* development.  
J. Cell Biol. 142; 1325-1335
- BERNARDINI M.L., MOUNIER J., D'HAUTEVILLE H., COQUIS-RANDON M. AND SANSONETTI P.J. (1989)  
Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 86; 3867-3871
- BIRNBOIM H.C. AND DOLY J. (1979)  
A rapid alkaline extraction for screening recombinant plasmid DNA.  
Nucleic Acid Res. 7; 1513-1523
- BRINDLE N.P., HOLT M.R., DAVIES J.E., PRICE C.J. AND CRITCHLEY D.R. (1996)  
The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in Vinculin.  
Biochem. J. 318; 753-757
- BROOME C.V. (1993)  
Listeriosis: Can we prevent it?  
ASM News 59; 444-446
- BRUNDAGE R.A., SMITH G.A., CAMILLI A., THERIOT J.A. AND PORTNOY D.A. (1993)  
Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 90; 11890-11894
- BUNNELL S.C., HENRY P.A., KOLLURI R., KIRCHHAUSEN T., RICKLES R.J. AND BERG L.J. (1996)  
Identification of Itk/Tsk src homology 3 domain ligands.  
J.Biol. Chem. 271; 25646-25656
- BURBELO P.D., DRECHSEL D. AND HALL A. (1995)  
A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both CDC42 and Rac GTPases.  
J.Biol. Chem. 8; 29071-29074
- CAMILLI A., TILNEY L.G. AND PORTNOY D.A. (1993)  
Dual role of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis.  
Mol. Microbiol. 8; 143-157
- CARL U.D., POLLMANN M., ORR E., GERTLER F.B., CHAKRABORTY T. AND WEHLAND J. (1999)  
Aromatic and basic residues within the EVH1 domain of VASP specify its interaction with proline-rich ligands.  
Curr. Biol. 9; 715-718

## Literaturverzeichnis

---

- CARLIER M.-F., LAURENT V., SANTOLINI J., MELKI R., DIDRY D., XIA G.-X., HONG Y., CHUA N.-H. AND PANTALONI D. (1997)  
Actin depolymerizing factor (ADF / cofilin) enhances the rate of filament turnover: Implication in actin-based motility.  
J. Cell Biol. 136; 1307-1323
- CARLIER M.-F. (1998)  
Control of actin dynamics.  
Curr. Opin. Cell Biol. 10; 45-51
- CARLSSON L., NYSTROM L.-E., SUNDKVIST I., MARKEY F. AND LINDBERG U. (1977)  
Actin polymerisability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in nonmuscle cells.  
J. Mol. Biol. 115; 465-483
- CHAKRABORTY T. AND GOEBEL W. (1988)  
Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes*.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 138; 41-48
- CHAKRABORTY T., LEIMEISTER-WÄCHTER M., DOMANN E., HARTL M., GOEBEL W., NICTERLEIN T. AND NOTERMANS S. (1992)  
Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene.  
J. Bacteriol. 174; 568-574
- CHAKRABORTY T., EBEL F., DOMANN E., NIEBUHR K., GERSTEL B., PISTOR S., TEMM-GROVE C.J., JOCKUSCH B.M., REINHARD M., WALTER U. AND WEHLAND J. (1995)  
A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells.  
EMBO J. 14; 1314-1321
- CICCHETTI G., MAURER P., WAGENER P. AND KOCKS C. (1999)  
Actin and phosphoinositide binding by the ActA protein of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*.  
J. Biol. Chem. 274; 33616-33626
- COSSART P. AND KOCKS C. (1994)  
The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*.  
Mol. Microbiol. 13; 395-402
- DABIRI G.A., SANGER J.M., PORTNOY D.A. AND SOUTHWICK F.S. (1990)  
*Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 87; 6068-6072
- DAGERT M. AND EHRLICH S.D. (1979)  
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *E.coli* cells.  
Gene 6; 23-28
- DERRY J.M.J., OCHS H.D. AND FRANCKE U. (1994)  
Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome.  
Cell 78, 635-644
- DOLD F.G., SANGER J.M. AND SANGER J.W. (1994)  
Intact alpha-actinin molecules are needed for both the assembly of actin into tails and the locomotion of *Listeria monocytogenes* inside infected cells.  
Cell Motil. Cytoskeleton 28; 97-107

## Literaturverzeichnis

---

- DOMANN E., WEHLAND J., ROHDE M., PISTOR S., HARTL M., GOEBEL W., LEIMEISTER-WÄCHTER M., WÜNSCHER M. AND CHAKRABORTY T. (1992)  
A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin.  
EMBO J. 11; 1981-1990
- DRAMSI S., DEHOUX P. AND COSSART P. (1993a)  
Common features of Gram-positive bacterial proteins involved in cell recognition.  
Mol. Microbiol. 9; 1119-1122
- DRAMSI S., KOCKS C., FORESTIER C. AND COSSART P. (1993b)  
Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*.  
Mol. Microbiol. 9; 931-941
- DRAMSI S., BISWAS I., MAGUIN E., BRAUN L., MASTROENI P. AND COSSART P. (1995)  
Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family.  
Mol. Microbiol. 16; 251-261
- DREES B.E., ANDREWS K.M AND BECKERLE M.C. (1999)  
Molecular dissection of Zyxin function reveals its involvement in cell motility.  
J. Cell. Biol. 147; 1549-1559
- EGILE C., LOISEL T.P., LAURENT V., LI R., PANTALONI D., SANSONETTI P.J. AND CARLIER M.-F. (1999)  
Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility.  
J. Cell Biol. 146; 1319-1332
- ESPAZE E.P. AND REYNAUD A.E. (1988)  
Antibiotic susceptibilities of *Listeria*. In vitro studies.  
Infection 16; 160
- FARBER J.M. AND PETERKIN P.I. (1991)  
*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen.  
Microbiol. Rev. 55 ;476-511
- FEDOROV A.A., FEDOROV E., GERTLER F.B. AND ALMO S.C. (1999)  
Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function.  
Nature Struct. Biol. 6; 661-665
- FINAN P.M., SOAMES C.J., WILSON L., NELSON D.L., STEWART D.M., TRUONG O., HSUAN J.J. AND KELLIE S. (1996)  
Identification of regions of the Wiskott-Aldrich syndrome protein responsible for association with selected Src homology 3 domains.  
J.Biol. Chem. 271; 26291-26295
- FRANK R. (1992)  
SPOT-synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support.  
Tetrahedron 48; 9217-9232

## Literaturverzeichnis

---

- FRANKEL S. AND MOOSEKER M.S. (1996)  
The actin-related proteins.  
Curr. Op. Cell Biol. 8; 30-37
- FRIEDERICH E., GOUIN E., HELLIO R., KOCKS C., COSSART P. AND LOUVARD D. (1995)  
Targeting of *Listeria monocytogenes* ActA protein to the plasma membrane as a tool to dissect both actin-based cell morphogenesis and ActA function.  
EMBO J. 14; 2731-2744
- FRISCHKNECHT E., CUDMORE S., MOREAU V., RECKMANN I., RÖTTGER S. AND WAY M. (1999a)  
Tyrosine phosphorylation is required for actin-based motility of Vaccinia but not *Listeria* or *Shigella*.  
Curr. Biol. 9; 89-92
- FRISCHKNECHT E., MOREAU V., RÖTTGER S., GONFLONI S., RECKMANN I., SUPERTI-FURGA G. AND WAY M. (1999b)  
Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine signalling.  
Nature 401; 926-929
- GAILLARD J.-L., BERCHE P. AND SANSONETTI P. (1986)  
Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 52; 50-55
- GAILLARD J.-L., BERCHE P., FREHEL C., GOUIN E. AND COSSART P. (1991)  
Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci.  
Cell 65; 1127-1141
- GELLIN B.G. AND BROOME C.V. (1989)  
Listeriosis.  
J. Am. Med. 261; 1313-1320
- GEOFFROY C., GAILLARD J.-L., ALOUF J.E. AND BERCHE P. (1987)  
Purification, characterisation and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*.  
Infect. Immun. 55; 1641-1646
- GERSTEL B., GRÖBE L., PISTOR S., CHAKRABORTY T. AND WEHLAND J. (1996)  
The ActA polypeptides of *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* harbor related binding sites for host microfilament proteins.  
Infect. Immun. 64; 1929-1936
- GERTLER F.B., COMER A.R., JUANG J.L., AHERN S.M., CLARK M.J., LIEBL E.C. AND HOFFMANN F.M. (1995)  
Enabled, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the *Drosophila* Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties.  
Genes Devel. 9; 521-533
- GERTLER F.B., NIEBUHR K., REINHARD M., WEHLAND J. AND SORIANO P. (1996)  
Mena, a relative of VASP and *Drosophila* Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics.  
Cell 87; 227-239
- GOLDBERG M.B. (1997)  
*Shigella* actin-based motility in the absence of vinculin.  
Cell Motil. Cytoskeleton 37; 44-53

## Literaturverzeichnis

---

- GOLDSCHMIDT-CLERMONT P.J., MACHESKY L.M., DOBERSTEIN S.K. AND POLLARD T.D. (1991)  
Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin.  
J. Cell Biol. 113; 1081-1089
- GOUIN E., DEHOUX P., MENGAUD J., KOCKS C. AND COSSART P. (1995)  
*iactA* of *Listeria ivanovii*, although distantly related to *Listeria monocytogenes actA*, restores actin tail formation in an *L.monocytogenes actA* mutant.  
Infect. Immun. 63; 2729-2737
- GRAHAM F.L. AND VAN DER EB A.J. (1973)  
A new technique for the assay of infectivity of Human Adenovirus 5 DNA.  
Virology 52; 456-467
- GRÖBE L. (1995)  
Charakterisierung funktionaler Domänen im ActA-Protein von *Listeria ivanovii*.  
Diplomarbeit, TU Braunschweig.
- GUMBINER B.M. (1993)  
Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules.  
Neuron 11; 551-564
- HAFFNER C., JARCHAU T., REINHARD M., HOPPE J., LOHMANN S.M. AND WALTER U. (1995)  
Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament associated protein VASP.  
EMBO J. 14; 19-27
- HALBRÜGGE M. AND WALTER U. (1989)  
Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets.  
Eur.J.Biochem. 185; 41-50
- HALBRÜGGE M., FRIEDRICH C., EIGENTHALER M., SCHANZENBACHER P. AND WALTER U. (1990)  
Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators.  
J.Biol. Chem. 265; 3088-3093
- HAUSER W., KNOBELOCH K.-P., EIGENTHALER M., GAMBARAYAN S., KRENN V., GEIGER J., GLAZOVA M., ROHDE E., HORAK I., WALTER U. AND ZIMMER M. (1999)  
Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 96; 8120-8125
- HONORE B., MADSEN P., ANDERSEN A.H. AND LEFFERS H. (1993)  
Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin 2.  
FEBS Lett. 330; 151-155
- HÜTTELMAIER S., HARBECK B., STEFFENS N.O., MESSERSCHMIDT T., ILLENBERGER S. AND JOCKUSCH B.M. (1999)  
Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP.  
FEBS Lett. 451; 68-74
- HYNES R.O. (1992)  
Integrins: Versatility, modulation, and signalling in cell adhesion.  
Cell 69; 11-25

## Literaturverzeichnis

---

- IMAI K., NONOYAMA S., MIKI H., MORIO T., FUKAMI K., ZHU Q., ARUFFO A., OCHS H.D., YATA J. AND TAKENAWA T. (1999)  
The Pleckstrin homology domain of the Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in the organization of the actin cytoskeleton.  
Clin. Immunol. 92; 128-137
- INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J. AND WHITE T.J. (eds.) (1990)  
PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, California.
- IRETON K., PAYRASTRE B., CHAP H., OGAWA W., SAKAUE H., KASUGA M. AND COSSART P. (1996)  
A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion.  
Science 274; 780-782
- JOCKUSCH B.M., BUBECK P., GIEHL K., KROEMKER M., MOSCHNER J., ROTHKEGEL M., RÜDIGER M., SCHLÜTER K., STANKE G. AND WINKLER J. (1995)  
The molecular architecture of focal adhesions.  
Annu. Rev. Cell Biol. 11; 379-416
- JOHNSON R.P. AND CRAIG S.W. (1995)  
F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains.  
Nature 373; 261-264
- JONCKHEERE V., LAMBRECHTS A., VANDEKERCKHOVE J. AND AMPE C. (1999)  
Dimerization of profilin2 upon binding the (GP<sub>5</sub>)<sub>3</sub> peptide from VASP overcomes the inhibition of actin nucleation by profilin2 and thymosin  $\beta$ 4.  
FEBS Lett. 447; 257-263
- JUNTILA J.R., NIEMALA S.I. AND HIRN J. (1988)  
Minimum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non haemolytic *Listeria*.  
J. Appl. Bacteriol. 65; 321-327
- KANG F., LAINE R.O., BUBB M.R., SOUTHWICK E.S. AND PURICH D.L. (1997)  
Profilin interacts with the Gly-Pro-Pro-Pro-Pro sequences of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): Implications for actin-based *Listeria* motility.  
Biochemistry 36; 8384-8392
- KANG F., PURICH D.L., AND SOUTHWICK E.S. (1999)  
Profilin promotes barbed-end actin filament assembly without lowering the critical concentration.  
J. Biol. Chem. 274; 36963-36972
- KARUNSAGAR I., KROHNE G. AND GOEBEL W. (1993)  
*Listeria ivanovii* is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization.  
Infect. Immun. 61; 162-169
- KATHARIOU S., METZ P., HOF H. AND GOEBEL W. (1987)  
Tn-916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*.  
J. Bacteriol. 169, 1291-1297
- KELLEHER J.F., ATKINSON S.J. AND POLLARD T.D. (1995)  
Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*.  
J. Cell Biol. 131; 385-397
- KOCH C.A., ANDERSON D., MORAN M.F., ELLIS C. AND PAWSON T. (1991)  
SH2 and SH3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic proteins.  
Science 252 ;668-674

## Literaturverzeichnis

---

- KOCKS C., GOUIN M., TABOURET M., BERCHE P., OHAYON H. AND COSSART P. (1992)  
*Listeria monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein.  
Cell 68; 521-531
- KOCKS C. AND COSSART P. (1994)  
Directional actin assembly by *Listeria monocytogenes* at the site of polar surface expression of the *actA* gene product involving the actin-bundling protein plastin (fimbrin).  
Infect. Agents Disease 2; 207-209
- KRAUSE M. (1999)  
Zyxin und Fyb/SLAP: Charakterisierung bekannter und neuer Bindungspartner der EVH1-Domäne der Ena/VASP-Proteinfamilie.  
Dissertation, TU Braunschweig.
- KREFT J., DUMBSKY M. AND THEISS S. (1995)  
The actin-polymerization protein from *Listeria ivanovii* is a large repeat protein which shows only limited amino acid sequence homology to ActA from *Listeria monocytogenes*.  
FEMS Microbiol. Lett. 126 ;113-122
- KYHSE-ANDERSEN J. (1984)  
Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.  
J. Biochem. Biophys. Meth. 10; 203-209
- LAEMMLI U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature 227; 680-685
- LAINE R.O., ZEILE W., KANG F., PURICH D.L. AND SOUTHWICK E.S. (1997)  
Vinculin proteolysis unmasks an ActA homolog for actin-based Shigella motility.  
J. Cell Biol. 138; 1255-1264
- LAMBRECHTS A., VERSCHELDE J.-L., JONCKHEERE V., GOETHALS M., VANDEKERCKHOVE J. AND AMPE C. (1997)  
The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences.  
EMBO J. 16; 484-494
- LANIER L.M., GATES M.A., WITKE W., MENZIES A.S., KWIATKOWSKI D., SORIANO P. AND GERTLER F.B. (1999)  
Mena is required for neurulation and commissure formation.  
Neuron 22; 313-325
- LASA I., DAVID V., GOUIN E., MARCHAND J.-B. AND COSSART P. (1995)  
The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator.  
Mol. Microbiol. 18; 425-436
- LASA I., GOUIN E., GOETHALS M., VANCOMPERNOLLE K., DAVID V., VANDEKERCKHOVE J. AND COSSART P. (1997)  
Identification of two regions in the N-terminal domain of ActA involved in the actin comet tail formation by *Listeria monocytogenes*.  
EMBO J. 16; 1531-1540
- LASSING I. AND LINDBERG U. (1985)  
Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin.  
Nature 314; 472-474



## Literaturverzeichnis

---

- LAURENT V., LOISEL T.P., HARBECK B., WEHMANN A., GRÖBE L., JOCKUSCH B.M., WEHLAND J., GERTLER F.B. AND CARLIER M.-F. (1999)  
Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*.  
J. Cell Biol. 144; 1245-1258
- LEIMEISTER-WÄCHTER M., HAFFNER C., DOMANN E., GOEBEL W. AND CHAKRABORTY T. (1990)  
Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 87; 8336-8340
- LEIMEISTER-WÄCHTER M., DOMANN E. AND CHAKRABORTY T. (1992)  
The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated.  
J. Bacteriol. 174; 947-952
- LETT M.C., SASAKAWA C., OKADA N., SAKAI T., MAKINO S., YAMADA M., KOMATSU K. AND YOSHIKAWA M. (1989)  
VirG, plasmid-coded virulence gene of *Shigella flexneri*: Identification of the VirG protein and determination of the complete sequence.  
J. Bacteriol. 171; 353-359
- LI R. (1997)  
Bee1, a yeast protein with homology to Wiskott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of the cortical actin cytoskeleton.  
J. Cell Biol. 136; 649-658
- LINGNAU A., DOMANN E., HUDEL M., BOCK M., NICHTERLEIN T., WEHLAND J. AND CHAKRABORTY T.C. (1995)  
Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms.  
Infect. Immun. 63; 3896-3903
- LOISEL T.P., BOUJEMAA R., PANTALONI D. AND CARLIER M.-F. (1999)  
Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins.  
Nature 401; 613-616
- MACALMA T., OTTE J., HENSLER M.E., BOCKHOLT S.M., LOUIS H.A., KALFF-SUSKE M., GRZESCHIK K.H., VON DER AHE D. AND BECKERLE M.C. (1996)  
Molecular characterization of human zyxin.  
J. Biol. Chem. 271; 31470-31478
- MACHESKY L.M., ATKINSON S.J., AMPE C., VANDEKERCKHOVE J. AND POLLARD T.D. (1994)  
Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose.  
J. Cell Biol. 127; 107-115
- MACHESKY L.M. (1997)  
Complex dynamics at the leading edge.  
Curr. Biol. 7; R164-R167
- MACHESKY L.M. AND INSALL R.H. (1998)  
Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin skeleton through the Arp2/3 complex.  
Curr. Biol. 8; 1347-1356

## Literaturverzeichnis

---

- MACHESKY L.M. AND GOULD K.L. (1999)  
The Arp2/3 complex: A multifunctional actin organizer.  
Curr. Op. Cell Biol. 11; 117-121
- MACHESKY L.M., MULLINS R.D., HIGGS H.N., KAISER D.A., BLANCHON L., MAY R.C., HALL M.E. AND POLLARD T.D. (1999)  
Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 96; 3739-3744
- MARCHAND J.-B., MOREAU P., PAOLETTI A. COSSART P., CARLIER M.-F. AND PANTALONI D. (1995)  
Actin-based movement of *Listeria monocytogenes*: Actin assembly results from the local maintenance of uncapped filament barbed ends at the bacterium surface.  
J. Cell Biol. 130; 331-343
- MARQUIS H., GOLDFINE H. AND PORTNOY D.A. (1997)  
Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*.  
J. Cell Biol. 137; 1381-1392
- MAY R.C., HALL M.E., NIGGS H.N., POLLARD T.D., CHAKRABORTY T., WEHLAND J., MACHESKY L.M. AND SECHI A.S. (1999)  
The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*.  
Curr. Biol. 9; 759-762
- MCCOLLUM D., FEOKTISTOVA A., MORPHEW M., BALASUBRAMANIAN M. AND GOULD K.L. (1996)  
The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin.  
EMBO J. 15; 6438-6446
- MENGAUD J. AND COSSART P. (1989)  
*Listeria monocytogenes*: A model system for molecular study of intracellular parasitism.  
Mol. Biol. Med. 6; 463-474
- MENGAUD J., DRAMSI S., GOUIN E., VAZQUEZ-BOLAND J.A., MILON G. AND COSSART P. (1991)  
Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated.  
Mol. Microbiol. 5; 2273-2283
- MICHAILLE J.-J., GOUY M., BLANCHET S. AND DURET L. (1995)  
Isolation and characterization of a cDNA encoding a chicken actin-like protein.  
Gene 154; 205-209
- MIKI H., MIURA K. AND TAKENAWA T. (1996)  
N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases.  
EMBO J. 15; 5326-5335
- MIKI H. AND TAKENAWA T. (1998a)  
Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeleton reorganization.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 243; 72-78
- MIKI H., SUETSUGO S. AND TAKENAWA T. (1998b)  
WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization.  
EMBO J. 17; 6932-6941

## Literaturverzeichnis

---

- MOGILNER A. AND OSTER G. (1996)  
Cell motility driven by actin polymerization.  
Biophys. J. 71; 3030-3045
- MOON A. AND DRUBIN D.G. (1995)  
The ADF/Cofilin proteins: Stimulus-responsive Modulators of actin dynamics.  
Mol. Biol. Cell 6; 1423-1431
- MOREAU V., MADANIA A., MARTIN R.P. AND WINSOR B. (1996)  
The *Saccharomyces cerevisiae* actin-related protein Arp2 is involved in the actin cytoskeleton.  
J. Cell Biol. 134; 117-132
- MULLINS R.D., STAFFORD W.F. AND POLLARD T.D. (1997)  
Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*.  
J. Cell Biol. 136; 331-343
- MULLINS R.D., HEUSER J.A. AND POLLARD T.D. (1998a)  
The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 95; 6180-6186
- MULLINS R.D., KELLEHER J.F., XU J. AND POLLARD T.D. (1998b)  
Arp2/3 complex from *Acanthamoeba* binds profilin and cross-links actin filaments.  
Mol. Biol. Cell 9; 841-852
- MULLIS E.G.D. AND FALOONA F.A. (1987)  
Specific synthesis of DNA in-vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.  
Methods Enzymol. 155; 335-350
- MURRAY P.R., KOBAYASHI G.S., PFALLER M.A. AND ROSENTHAL K.S. (1986)  
Genus *Listeria* Pirie, 1940, 383AL. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Band 2. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt (Hrsg.), Williams & Wilkins, Baltimore; 1235-1245
- NIEBUHR K., EBEL F., FRANK R., REINHARD R., DOMANN E., CARL U.D., WALTER U., GERTLER F.B., WEHLAND J. AND CHAKRABORTY T. (1997)  
A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, protein module present in the Ena/VASP family.  
EMBO J. 16; 5433-5444
- PANTALONI D. AND CARLIER M.-F. (1993)  
How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin  $\beta$ 4.  
Cell 75; 1007-1014
- PETERS J.H. UND BAUMGARTEN H. (1990)  
Monoklonale Antikörper-Herstellung und Charakterisierung. 2. Auflage; Springer Verlag.
- PISTOR S., CHAKRABORTY T., NIEBUHR K., DOMANN E. AND WEHLAND J. (1994)  
The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton.  
EMBO J. 13; 758-763
- PISTOR S., CHAKRABORTY T., WALTER U. AND WEHLAND J. (1995)  
The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins.  
Curr. Biol. 5; 517-525

## Literaturverzeichnis

---

- PISTOR S., GRÖBE L., DOMANN E., GERSTEL B., MACHESKY L.M., CHAKRABORTY T.,  
AND WEHLAND J. (eingereicht)  
Mutations of Arginine residues within the <sup>146</sup>-KKRRK-<sup>150</sup> motif of the ActA protein of *Listeria monocytogenes* abolish intracellular motility by interfering with the recruitment of the Arp2/3 complex.
- POLLARD T.D AND MOOSEKER M.S. (1981)  
Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores.  
J. Cell Biol. 88; 654-659
- POLLARD T.D. (1990)  
Actin.  
Curr. Opin. Cell Biol. 2; 33-40
- PORTNOY D.A., CHAKRABORTY T., GOEBEL W. AND COSSART P. (1992)  
Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis.  
Infect. Immun. 60; 1263-1268
- PREHODA K.E., LEE D.J. AND LIM W.A. (1999)  
Structure of the Enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: A key component in the spatial control of actin assembly.  
Cell 97; 471-480
- PRICE G.J., JONES P., DAVISON M.D., PATEL B., BENDORI R., GEIGER B. AND CHRITCHLEY D.R. (1989)  
Primary sequence and domain structure of chicken vinculin.  
Biochem. J. 259; 453-461
- RAMESH N., ANTON I.M., HARTWIG J.H. AND GEHA R.S. (1997)  
WIP, a protein associated with Wiskott-Aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 94; 14671-14676
- REINHARD M., HALBRÜGGE M., SCHEER U., WIEGAND C., JÖCKUSCH B.M. AND WALTER U. (1992)  
The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts.  
EMBO J. 11; 2063-2070
- REINHARD M., GIEHL K., ABEL K., HÄFFNER C., JARCHAU T., HOPPE V., JÖCKUSCH B.M. AND WALTER U. (1995a)  
The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins.  
EMBO J. 14; 1583-1589
- REINHARD M., JOUVENAL K., TRIPIER D. AND WALTER U. (1995b)  
Identification, purification and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 92; 7956-796
- RIVERO-LEZCANO O.M., MARCILLA A., SAMESHIMA J.H. AND ROBBINS K.C. (1995)  
Wiskott Aldrich syndrome protein physically associated with Nck through Src homology 3 domain.  
Mol. Cell. Biol. 15; 5725-5731

## Literaturverzeichnis

---

- ROHATGI R., MA L., MIKI H., LOPEZ M., KIRCHHAUSEN T., TAKENAWA T. AND KIRSCHNER M. (1999)  
The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links CDC42-dependent signals to actin assembly.  
Cell 97; 221-231
- ROTTNER K., BEHRENDT B., SMALL J.V. AND WEHLAND J. (1999)  
VASP dynamics during lamellipodial protrusion.  
Nature Cell Biol. 1; 321-322
- SADLER I., CRAWFORD A.W., MICHELSEN J.W. AND BECKERLE M.C. (1992)  
Zyxin and cCRP: Two interactive LIM domain proteins associated with the cytoskeleton.  
J. Cell Biol. 119; 1573-1587
- SANGER J.M., SANGER J.W. AND SOUTHWICK E.S. (1992)  
Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of *Listeria monocytogenes*.  
Infect. Immun. 60; 3609-3619
- SCHAFER D.A. AND COOPER J.A. (1995)  
Control of actin assembly at filament ends.  
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11; 497-518
- SCHÄFERKORDT S. AND CHAKRABORTY T. (1995)  
Vector plasmids for insertional mutagenesis and directional cloning in *Listeria* spp.  
Biotechniques 19; 720-725
- SECHI A.S., WEHLAND J. AND SMALL J.V. (1997)  
The isolated comet tail pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: A tail of two actin filament populations, long and axial and short and random.  
J. Cell Biol. 137; 155-167
- SEELIGER H.P.R. AND JONES D. (1986)  
Genus *Listeria*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Band 2. Hrsg.: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt. Williams and Wilkins, Baltimore.
- SMITH G.A., PORTNOY D.A. AND THERIOT J.A. (1995)  
Asymmetric distribution of the *Listeria monocytogenes* ActA protein is required and sufficient to direct actin-based motility.  
Mol. Microbiol. 17; 413-423
- SMITH G.A., THERIOT J.A. AND PORTNOY D.A. (1996)  
The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin.  
J. Cell Biol. 135; 647-660
- SOHN R.H. AND GOLDSCHMIDT-CLERMONT P.J. (1994)  
Profilin: At the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton.  
Bioessays 16; 465-472
- SPECTOR I., SHOCHET N.R., BLASBERGER D. AND KASHMANN Y. (1989)  
Latrunculins: Novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth. Comparison with Cytochalasin D.  
Cell Motil. Cytoskeleton 13; 127-144

## Literaturverzeichnis

---

- SUETSUGO S., MIKI H. AND TAKENAWA T. (1998)  
The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation.  
EMBO J. 17; 6516-6526
- SUN H.-Q., KWIATKOWSKI K. AND YIN H. (1995)  
Actin monomer binding proteins.  
Curr. Opin. Cell Biol. 7; 102-110
- SUZUKI T., SAGA S. AND SASAKAWA C. (1996)  
Functional analysis of Shigella VirG domains essential for interaction with vinculin and actin-based motility.  
J.Biol. Chem. 271; 21878-21885
- SUZUKI T., MIKI H., TAKENAWA T. AND SASAKAWA C. (1998)  
Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of *Shigella flexneri*.  
EMBO J. 17; 2767-2776
- SWARTZ M.A., WELCH D.F., NARAYANAN R.P. AND GREENFIELD R.A. (1991)  
Catalase-negative *Listeria monocytogenes* causing meningitis in an adult. Clinical and laboratory features.  
Am. J. Clin. Pathol. 96; 130-133
- SYMONS M., DERRY J.M.J., KARLAK B., JIANG S., LEMAHIEU V., MCCORMICK F., FRANCKE U. AND ABO A. (1996)  
Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization.  
Cell 84; 723-734
- TANAKA M. AND SHIBATA H. (1985)  
Poly (L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin.  
Eur. J. Biochem. 151; 291-297
- TANAKA T., SHIBASAKI E., ISHIKAWA M., HIRANO N., SAKAI R., NISHIDA J., TAKENAWA T. AND HIRAI H. (1992)  
Molecular cloning of bovine actin-like protein, actin2.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 187; 1022-1028
- TEMM-GROVE C.J., JOCKUSCH B.M., ROHDE M., NIEBUHR K., CHAKRABORTY T. AND WEHLAND J. (1994)  
Exploitation of microfilament proteins by *Listeria monocytogenes*: Microvillus-like composition of the comet tails and vectorial spreading in polarized epithelial sheets.  
J. Cell Sci. 107; 2951-2960
- THERIOT J.A., MITCHISON T.J., TILNEY L.G. AND PORTNOY D.A. (1992)  
The rate of actin-based motility of intracellular LISTERIA MONOCYTOGENES equals the rate of actin polymerization.  
Nature 357; 257-260
- THERIOT J.A., ROSENBLATT J., PORTNOY D.A., GOLDSCHMIDT-CLERMONT P.J. AND MITCHISON T.J. (1994)  
Involvement of profilin in the actin-based motility of *Listeria monocytogenes* in cells and in cell-free extracts.  
Cell 76; 505-517

## Literaturverzeichnis

---

- TILNEY L.G. AND PORTNOY D.A. (1989)  
Actin filaments and the growth, movement and spread of the intracellular bacterial parasite *Listeria monocytogenes*.  
J. Cell Biol. 109; 1597-1608
- TILNEY L.G., CONNELLY P.S. AND PORTNOY D.A. (1990)  
Actin filament nucleation by the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*.  
J. Cell Biol. 111; 2979-2988
- TILNEY L.G., DEROSIER D.J. AND TILNEY M.S. (1992a)  
How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton: I. Formation of a tail and how that tail might be involved in movement.  
J. Cell Biol. 118; 71-81
- TILNEY L.G., DEROSIER D.J. WEBER A. AND TILNEY M.S. (1992b)  
How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton: II. Nucleation, actin filament polarity, filament assembly and evidence for a pointed end capper.  
J. Cell Biol. 118; 83-93
- VAZQUEZ-BOLAND J.A., KOCKS C., DRAMSI S., OHAYON H., GEOFFROY C., MENGAUD J. AND COSSART P. (1992)  
Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread.  
Infect. Immun. 60; 219-230
- WALDMANN R., BAUER S., GÖBEL C., HOFMANN F., JAKOBS K.H. AND WALTER U. (1986)  
Demonstration of cGMP-dependent protein kinase and cGMP-dependent phosphorylation in cell-free extracts of platelets.  
Eur. J. Biochem. 158; 203-210
- WALDMANN R., NIEBERDING M. AND WALTER U. (1987)  
Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases.  
Eur. J. Biochem. 167; 441-448
- WATANABE N., MADAULE P., REID T., ISHIZAKI T., WATANABE G., KAKIZUKA A., SAITO Y., NAKAO K., JOCKUSCH B.M. AND NARUMIYA S. (1997)  
p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin.  
EMBO J. 16; 3044-3056
- WEGNER A. AND ENGEL J. (1975)  
Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments.  
Biophys. Chem. 3; 215-225
- WEISS J. AND SEELIGER H.P.R. (1975)  
Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature.  
Appl. Microbiol. 30; 29-32
- WELCH D.F. (1987)  
Role of catalase and superoxide dismutase in the virulence of *Listeria monocytogenes*.  
Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 138; 265-268

## Literaturverzeichnis

---

- WELCH M.D., IWAMATSU A. AND MITCHISON T.J. (1997a)  
Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*.  
Nature 385; 265-269
- WELCH M.D., DEPACE A.H., VERMA S., IWAMATSU A. AND MITCHISON T.J. (1997b)  
The human Arp2/3 complex is composed of evolutionary conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly.  
J. Cell Biol. 138; 375-384
- WELCH M.D., ROSENBLATT J., SKOBLE J., PORTNOY D.A. AND MITCHISON T.J. (1998)  
Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation.  
Nature 281; 105-108
- WESTMEYER A., RUHNAU K., WEGNER A. AND JOCKUSCH B.M. (1990)  
Antibody mapping of functional domains in vinculin.  
EMBO J. 9; 2071-2078
- WINTER D., LECHLER T. AND LI R. (1999)  
Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP family protein.  
Curr. Biol. 9; 501-504
- WOOTOON J.C. (1994)  
Non-globular domains in protein sequences: Automated segmentation using complexity measures.  
Comput. Chem. 18; 269-285
- WU Y., SPENCER S.D. AND LASKY L.A. (1998)  
Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein.  
J.Biol. Chem. 273; 5765-5770
- YARAR D., TO W., ABO A. AND WELCH M.D. (1999)  
The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex.  
Curr. Biol. 9; 555-559
- ZIGMOND S.H. (1998)  
Actin cytoskeleton: The Arp2/3 complex gets to the point.  
Curr. Biol. 8; R654-R657



## 7 Anhang

### A Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ActA ( <i>actA</i> )	Aktin-Nukleationsfaktor (-Gen)
Arc ( <i>arc</i> )	actin-related-protein complex protein (-Gen)
Arp ( <i>arp</i> )	Actin related protein (-Gen)
As	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BHI	Brain and Heart Infusion
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvanz
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
Evl	Ena-VASP-like
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-piperazinethane sulfonic acid
HEBS	Hepes gepufferte Saline
Hly ( <i>hly</i> )	Listeriolysin (-Gen)
IFA	inkomplettes Freund'sches Adjuvanz
InlA ( <i>inlA</i> )	Internalin A (-Gen)
InlB ( <i>inlB</i> )	Internalin B (-Gen)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
konz.	konzentriert
l	Liter
L.	Listeria

## Anhang

---

### Verzeichnis der Abkürzungen

M	Molar
mA	Milliampère
mAk	monoklonaler Antikörper
MEM	Minimal Essential Medium
Min.	Minuten
Mena	mammalian Enabled
Mpl ( <i>mpl</i> )	Metalloprotease (-Gen)
MPSV	Myeloproliferatives Sarcomavirus
Mpl ( <i>mpl</i> )	Metalloprotease (-Gen)
MW	Molekulargewicht
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PlcA ( <i>plcA</i> )	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (-Gen)
PlcB ( <i>plcB</i> )	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (-Gen)
PrfA ( <i>prfA</i> )	Positiver Regulationsfaktor (-Gen)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodium-Dodecyl-Sulfat)
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SLCC	Special Listeria Culture Collection, Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBS-T	TBS mit Tween 20
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

### **B Danksagungen**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Zellbiologie und Immunologie der »Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH« (GBF) durchgeführt.

Mein Dank gilt Prof. Jürgen Wehland für die engagierte Betreuung meiner Arbeit. Durch ihn habe ich einen guten Einblick in die Wissenschaftswelt erhalten.

Ich danke Dr. Dirk Heinz für die Bereitschaft, das Ko-Referat zu übernehmen.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Susanne Pistor und Reiner Munder für die hervorragende Zusammenarbeit und viele fruchtbare Diskussionen, sowie an Marlies Konradt für die außerordentliche Hilfe bei Fusionen und Subklonierungen.

Natürlich ein ganz großes Dankeschön an alle MitarbeiterInnen unserer Arbeitsgruppe für das tolle Arbeitsklima: Barbara Behrendt, Dr. Uwe Carl, Dr. Judith Dädelow, Dr. Uwe Dehmel, Brigitte Denker, Dr. Christian Erck, Marcus Geese, Dr. Birgit Gerstel, Petra Hagendorff, Dr. Uwe Kärst, Dr. Matthias Krause, Dr. Dave Monner, Amanda Mühlmann, Dr. Simone Müller, Dr. Kirsten Niebuhr-Ebel und Dr. Antonio Sechi.

Gesine und Thorben danke ich für die private Ausgeglichenheit, die ich durch sie hatte und für die Toleranz und Geduld, wenn sie auf mich warten mußten.

## C Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

I. ActA: 1920 nt; 639 As; MW=70,3 kDa; pI=4,93

	GTGGGATTAA	ACAGATTTAT	GCGTGCGATG	ATGGTGGTTC	TCATTACTGC	CAATTGCATT	60
	CACCCTAATT	TGTCTAAATA	CGCACGCTAC	TACCACCAAG	AGTAATGACG	GTTAACGTAA	
1	V	G	L	N	R	F	M
	R	A	M	M	V	V	L
	I	T	A	N	C	I	
	ACGATTAACC	CCGACATAAT	ATTTGCAGCG	ACAGATAGCG	AAGATTCTAG	TCTAAACACA	120
	TGCTAATTGG	GGCTGTATTA	TAAACGTCGC	TGTCTATCGC	TTCTAAGATC	AGATTTGTGT	
21	T	I	N	P	D	I	I
	F	A	A	T	D	S	E
	D	S	S	L	N	T	
	GATGAATGGG	AAGAAGAAAA	AACAGAAGAG	CAACCAAGCG	AGGTAAATAC	GGGACCAAGA	180
	CTACTTACCC	TTCTTCTTTT	TTGTCTTCTC	GTTGGTTCGC	TCCATTATATG	CCCTGGTTCT	
41	D	E	W	E	E	E	K
	T	E	E	Q	P	S	E
	V	N	T	G	P	R	
	TACGAAACTG	CACGTGAAGT	AAGTTCACGT	GATATTAAAG	AACTAGAAAA	ATCGAATAAA	240
	ATGCTTTGAC	GTGCACTTCA	TTCAAGTGCA	CTATAATTTT	TTGATCTTTT	TAGCTTATTT	
61	Y	E	T	A	R	E	V
	S	S	R	D	I	K	E
	L	E	K	S	N	K	
	GTGAGAAATA	CGAACAAAGC	AGACCTAATA	GCAATGTTGA	AAGAAAAAGC	AGAGAAAGGT	300
	CACTCTTTAT	GCTTGTTTCG	TCTGGATTAT	CGTTACAAC	TTCTTTTTTCG	TCTCTTTCCA	
81	V	R	N	T	N	K	A
	D	L	I	A	M	L	K
	E	K	A	E	K	G	
	CCAAATATCA	ATAATAACAA	CAGTGAACAA	ACTGAGAATG	CGGCTATAAA	TGAAGAGGCT	360
	GGTTTATAGT	TATTATTGTT	GTCACCTTGT	TGACTCTTAC	GCCGATATTT	ACTTCTCCGA	
101	P	N	I	N	N	N	N
	S	E	Q	T	E	N	A
	A	I	N	E	E	A	
	TCAGGAGCCG	ACCGACCAGC	TATACAAGTG	GAGCGTCGTC	ATCCAGGATT	GCCATCGGAT	420
	AGTCCTCGGC	TGGCTGGTCG	ATATGTTTAC	CTCGCAGCAG	TAGGTCCTAA	CGGTAGCCTA	
121	S	G	A	D	R	P	A
	I	Q	V	E	R	R	H
	P	G	L	P	S	D	
	AGCGCAGCGG	AAATTAAAAA	AAGAAGGAAA	GCCATAGCAT	CATCGGATAG	TGAGCTTGAA	480
	TCGCGTCGCC	TTTAATTTTT	TTCTTCCTTT	CGGTATCGTA	GTAGCCTATC	ACTCGAACTT	
141	S	A	A	E	I	K	K
	R	R	K	A	I	A	S
	S	D	S	E	L	E	
	AGCCTTACTT	ATCCGGATAA	ACCAACAAAA	GTAAATAAGA	AAAAAGTGGC	GAAAGAGTCA	540
	TCGGAATGAA	TAGGCCTATT	TGGTTGTTTT	CATTTATTCT	TTTTTCACCG	CTTTCTCAGT	
161	S	L	T	Y	P	D	K
	P	T	K	V	N	K	K
	K	V	A	K	E	S	
	GTTGCGGATG	CTTCTGAAAG	TGACTTAGAT	TCTAGCATGC	AGTCAGCAGA	TGAGTCTTCA	600
	CAACGCCTAC	GAAGACTTTC	ACTGAATCTA	AGATCGTACG	TCAGTCGTCT	ACTCAGAAAGT	
181	V	A	D	A	S	E	S
	D	L	D	S	S	M	Q
	S	A	D	E	S	S	

## Anhang

### I. ActA (Fortsetzung)

	CCACAACCTT	TAAAAGCAAA	CCAACAACCA	TTTTTCCCTA	AAGTATTTAA	AAAAATAAAA	660
	GGTGTGGAA	ATTTTCGTTT	GGTTGTTGGT	AAAAAGGGAT	TTCATAAATT	TTTTTATTTT	
201	P Q P L	K A N	Q Q P	F F P K	V F K	K I K	
	GATGCGGGGA	AATGGGTACG	TGATAAAATC	GACGAAAATC	CTGAAGTAAA	GAAAGCGATT	720
	CTACGCCCT	TTACCCATGC	ACTATTTTAG	CTGCTTTTAG	GACTTCATTT	CTTTCGCTAA	
221	D A G K	W V R	D K I	D E N P	E V K	K A I	
	GTTGATAAAA	GTGCAGGGTT	AATTGACCAA	TTATTAACCA	AAAAGAAAAG	TGAAGAGGTA	780
	CAACTATTTT	CACGTCCCAA	TTAACTGGTT	AATAATTGGT	TTTTCTTTTC	ACTTCTCCAT	
241	V D K S	A G L	I D Q	L L T K	K K S	E E V	
	AATGCTTCGG	ACTTCCCGCC	ACCACCTACG	GATGAAGAGT	TAAGACTTGC	TTTGCCAGAG	840
	TTACGAAGCC	TGAAGGGCGG	TGGTGGATGC	CTACTTCTCA	ATTCTGAACG	AAACGGTCTC	
261	N A S D	F P P	P P T	D E E L	R L A	L P E	
	ACACCAATGC	TTCTTGTTTT	TAATGCTCCT	GCTACATCAG	AACCGAGCTC	ATTCGAATTT	900
	TGTGGTTACG	AAGAACCAAA	ATTACGAGGA	CGATGTAGTC	TTGGCTCGAG	TAAGCTTAAA	
281	T P M L	L G F	N A P	A T S E	P S S	F E F	
	CCACCACCAC	CTACGGATGA	AGAGTTAAGA	CTTGCTTTGC	CAGAGACGCC	AATGCTTCTT	960
	GGTGGTGGTG	GATGCCTACT	TCTCAATTCT	GAACGAAACG	GTCTCTGCGG	TTACGAAGAA	
301	P P P P	T D E	E L R	L A L P	E T P	M L L	
	GGTTTTAATG	CTCCTGCTAC	ATCGGAACCG	AGCTCGTTTCG	AATTTCCACC	GCCTCCAACA	1020
	CCAAAATTAC	GAGGACGATG	TAGCCTTGGC	TCGAGCAAGC	TTAAAGGTGG	CGGAGGTTGT	
321	G F N A	P A T	S E P	S S F E	F P P	P P T	
	GAAGATGAAC	TAGAAATCAT	CCGGGAAACA	GCATCCTCGC	TAGATTCTAG	TTTTACAAGA	1080
	CTTCTACTTG	ATCTTTAGTA	GGCCCTTTGT	CGTAGGAGCG	ATCTAAGATC	AAAATGTTCT	
341	E D E L	E I I	R E T	A S S L	D S S	F T R	
	GGGGATTTAG	CTAGTTTGAG	AAATGCTATT	AATCGCCATA	GTCAAAATTT	CTCTGATTTT	1140
	CCCCTAAATC	GATCAAATCT	TTTACGATAA	TTAGCGGTAT	CAGTTTTTAA	GAGACTAAAG	
361	G D L A	S L R	N A I	N R H S	Q N F	S D F	
	CCACCAATCC	CAACAGAAGA	AGAGTTGAAC	GGGAGAGGCG	GTAGACCAAC	ATCTGAAGAA	1200
	GGTGGTTAGG	GTTGTCTTCT	TCTCAACTTG	CCCTCTCCGC	CATCTGGTTG	TAGACTTCTT	
381	P P I P	T E E	E L N	G R G G	R P T	S E E	
	TTTAGTTTCG	TGAATAGTGG	TGATTTTACA	GATGACGAAA	ACAGCGAGAC	AACAGAAGAA	1260
	AAATCAAGCG	ACTTATCACC	ACTAAAATGT	CTACTGCTTT	TGTCGCTCTG	TTGTCTTCTT	
401	F S S L	N S G	D F T	D D E N	S E T	T E E	

## Anhang

### I. ActA (Fortsetzung)

	GAAATTGATC	GCCTAGCTGA	TTTAAGAGAT	AGAGGAACAG	GAAAACACTC	AAGAAATGCG	1320
	CTTTAACTAG	CGGATCGACT	AAATTCTCTA	TCTCCTTGTC	CTTTTGTGAG	TTCTTTACGC	
421	E I D R	L A D	L R D	R G T G	K H S	R N A	
	GGTTTTTTTAC	CATTAAATCC	GTTTGCTAGC	AGCCCGGTTC	CTTCGTTAAG	TCCAAAGGTA	1380
	CCAAAAAATG	GTAATTTAGG	CAAACGATCG	TCGGGCCAAG	GAAGCAATTC	AGGTTTCCAT	
441	G F L P	L N P	F A S	S P V P	S L S	P K V	
	TCGAAAATAA	GCGCACCGGC	TCTGATAAGT	GACATAACTA	AAAAAACGCC	ATTTAAGAAT	1440
	AGCTTTTATT	CGCGTGGCCG	AGACTATTCA	CTGTATTGAT	TTTTTTGCGG	TAAATTCTTA	
461	S K I S	A P A	L I S	D I T K	K T P	F K N	
	CCATCACAGC	CATTAAATGT	GTTTAATAAA	AAAACTACAA	CGAAAACAGT	GACTAAAAAA	1500
	GGTAGTGTCG	GTAATTTACA	CAAATTATTT	TTTTGATGTT	GCTTTTGTCA	CTGATTTTTT	
481	P S Q P	L N V	F N K	K T T T	K T V	T K K	
	CCAACCCCTG	TAAAGACCGC	ACCAAAGCTA	GCAGAACTTC	CTGCCACAAA	ACCACAAGAA	1560
	GGTTGGGGAC	ATTTCTGGCG	TGGTTTCGAT	CGTCTTGAAG	GACGGTGTTT	TGGTGTTCTT	
501	P T P V	K T A	P K L	A E L P	A T K	P Q E	
	ACCGTACTTA	GGGAAAATAA	AACACCCTTT	ATAGAAAAAC	AAGCAGAAAC	AAACAAGCAG	1620
	TGGCATGAAT	CCCTTTTATT	TTGTGGGAAA	TATCTTTTTG	TTCGTCTTTG	TTTGTTTCGTC	
521	T V L R	E N K	T P F	I E K Q	A E T	N K Q	
	TCAATTAATA	TGCCGAGCCT	ACCAGTAATC	CAAAAAGAAG	CTACAGAGAG	CGATAAAGAG	1680
	AGTTAATTAT	ACGGCTCGGA	TGGTCATTAG	GTTTTTCTTC	GATGTCTCTC	GCTATTTCTC	
541	S I N M	P S L	P V I	Q K E A	T E S	D K E	
	GAAATGAAAC	CACAAACCGA	GGAAAAAATG	GTAGAGGAAA	GCGAATCAGC	TAATAACGCA	1740
	CTTTACTTTG	GTGTTTGGCT	CCTTTTTTTAC	CATCTCCTTT	CGCTTAGTCG	ATTATTGCGT	
561	E M K P	Q T E	E K M	V E E S	E S A	N N A	
	AACGGAAAAA	ATCGTTCTGC	TGGCATTGAA	GAAGGAAAAAC	TAATTGCTAA	AAGTGCAGAA	1800
	TTGCCTTTTT	TAGCAAGACG	ACCGTAACTT	CTTCCTTTTG	ATTAACGATT	TTCACGTCTT	
581	N G K N	R S A	G I E	E G K L	I A K	S A E	
	GACGAAAAAG	CGAAGGAAGA	ACCAGGGAAC	CATACGACGT	TAATTCTTGC	AATGTTAGCT	1860
	CTGCTTTTTT	GCTTCCTTCT	TGGTCCCTTG	GTATGCTGCA	ATTAAGAACG	TTACAATCGA	
601	D E K A	K E E	P G N	H T T L	I L A	M L A	
	ATTGGCGTGT	TCTCTTTAGG	GGCGTTTATC	AAAATTATTC	AATTAAGAAA	AAATAATTAA	1920
	TAACCGCACA	AGAGAAATCC	CCGCAAATAG	TTTTAATAAG	TTAATTCTTT	TTTATTAATT	
621	I G V F	S L G	A F I	K I I Q	L R K	N N .	

## Anhang

### II. Arp3: 1257 nt; 418 As; MW=47,4 kDa; pI=5,7

	ATGGCGGGAC	GGCTGCCGGC	CTGTGTGGTG	GACTGTGGCA	CGGGGTATAC	50
	TACCGCCCTG	CCGACGGCCG	GACACACCAC	CTGACACCGT	GCCCCATATG	
1	M A G R	L P A	C V V	D C G T	G Y T	
	AAAAGTAGGA	TATGCTGGAA	ATACAGAACC	ACAGTTTATC	ATCCCTTCCT	100
	TTTTGATCCT	ATACGACCTT	TATGTCTTGG	TGTCAAATAG	TAGGGAAGGA	
18	K L G	Y A G N	T E P	Q F I	I P S C	
	GTATTGCTAT	TAAGGAGTCA	GCAAAAGTGG	GTGATCAAGC	TCAAAGGAGG	150
	CATAACGATA	ATTCTTCAGT	CGTTTTACCC	CACTAGTTTCG	AGTTTCTCTC	
35	I A I	K E S	A K V G	D Q A	Q R R	
	GTGATGAAAG	GTGTTGATGA	CCTAGACTTC	TTCATTGGTG	ATGAAGCAAT	200
	CACTACTTTC	CACAACTACT	GGATCTGAAG	AAGTAACCAC	TACTTCGTTA	
51	V M K G	V D D	L D F	F I G D	E A I	
	AGAAAAACCT	ACATATGCAA	CAAAGTGGCC	AATCCGCCAT	GGTATAGTTG	250
	TCTTTTTGGA	TGTATACGTT	GTTTCACCGG	TTAGGCGGTA	CCATATCAAC	
68	E K P	T Y A T	K W P	I R H	G I V E	
	AAGATTGGGA	CTTAATGGAA	AGGTTTATGG	AGCAAGTGAT	CTTTAAATAT	300
	TTCTAACCCCT	GAATTACCTT	TCCAAATACC	TCGTTCACTA	GAAATTTATA	
85	D W D	L M E	R F M E	Q V I	F K Y	
	TTAAGGGCAG	AACCTGAAGA	CCATTATTTT	CTTTTGACTG	AACCTCCATT	350
	AATTCCCCTC	TTGGACTTCT	GGTAATAAAA	GAAACTGAC	TTGGAGGTAA	
101	L R A E	P E D	H Y F	L L T E	P P L	
	GAATACTCCA	GAAAACAGGG	AATATACTGC	TGAAATAATG	TTTGAGTCCT	400
	CTTATGAGGT	CTTTTGTCCC	TTATATGACG	ACTTTATTAC	AAACTCAGGA	
118	N T P	E N R E	Y T A	E I M	F E S F	
	TCAATGTTCC	AGGCTTGTAC	ATTGCTGTGC	AGGCTGTTCT	TGCCTTAGCT	450
	AGTTACAAGG	TCCGAACATG	TAACGACACG	TCCGACAAGA	ACGGAATCGA	
135	N V P	G L Y	I A V Q	A V L	A L A	
	GCATCTTGGA	CCTCAAGACA	AGTAGGAGAA	CGGACGTTGA	CCGGTACGGT	500
	CGTAGAACCT	GGAGTTCTGT	TCATCCTCTT	GCCTGCAACT	GGCCATGCCA	
151	A S W T	S R Q	V G E	R T L T	G T V	
	AATAGACAGT	GGAGATGGTG	TCACTCATGT	CATTCTGTGT	GCTGAAGGGT	550
	TTATCTGTCA	CCTCTACCAC	AGTGAGTACA	GTAAGGACAC	CGACTTCCCA	
168	I D S	G D G V	T H V	I P V	A E G Y	
	ATGTGATTGG	CAGCTGTATT	AAACACATTC	CAATCGCAGG	ACGAGATATA	600
	TACACTAACC	GTCGACATAA	TTTGIGTAAAG	GTTAGCGTCC	TGCTCTATAT	
185	V I G	S C I	K H I P	I A G	R D I	
	ACATATTTTA	TTCAGCAACT	GCTGAGAGAC	CGAGAAGTAG	GAATCCCTCC	650
	TGTATAAAAT	AAGTCGTTGA	CGACTCTCTG	GCTCTTCATC	CTTAGGGAGG	
201	T Y F I	O O L	L R D	R E V G	I P P	

## Anhang

### II. Arp3: (Fortsetzung)

	AGAACAATCC TTGGAAACTG CTAAGGCAGT AAAGGAGCGC TATAGTTATG	700
218	TCTTGTTAGG AACCTTTGAC GATTCGGTCA TTTCCCTCGCG ATATCAATAC E Q S L E T A K A V K E R Y S Y V	
	TCTGCCCAGA TTTAGTAAAA GAATTTAACA AGTATGATAC AGATGGGTCA	750
235	AGACGGGICT AAATCATTTT CTTAAATTGT TCATACTATG TCTACCCAGT C P D L V K E F N K Y D T D G S	
	AAATGGATTA AACAGTATAC TGGAATCAAT GCTATCTCAA AGAAAGAGTT	800
251	TTTACCTAAT TTGTCATATG ACCTTAGTTA CGATAGAGTT TCTTTCTCAA K W I K Q Y T G I N A I S K K E F	
	TTCTATCGAT GTTGGTTATG AGAGATTTT GGGACCTGAA ATCTTTTTTC	850
268	AAGATAGCTA CAACCAATAC TCTCTAAAA CCCTGGACTT TAGAAAAAAG S I D V G Y E R F L G P E I F F H	
	ATCCAGAGTT TGCTAATCCA GACTTTACAC AACCTATCTC AGAAGTTGTA	900
285	TAGGTCCTCAA ACCATTAGGT CTGAAATGTG TTGGATAGAG TCTTCAACAT P E F A N P D F T Q P I S E V V	
	GATGAAGTAA TTCAGAATTG TCCTATTGAT GTCAGACGTC CTCTCTACAA	950
301	CTACTTCATT AAGTCTTAAC AGGATAACTA CAGTCGTCAG GAGAGATGTT D E V I Q N C P I D V R R P L Y K	
	GAATATTGTC CTCTCTGGAG GTTCAACCAT GTTCAGGGAC TTTGGACGTC	1000
318	CTTATAACAG GAGAGACCTC CAAGTTGGTA CAAGTCCCTG AAACCTGCAG N I V L S G G S T M F R D F G R R	
	GCTTGCAAAG AGATTTGAAA AGAACTGTAG ATGCCCGGCT GAAATTAAGT	1050
335	CGAACGTTTC TCTAAACTTT TCTTGACATC TACGGGCCGA CTTTAATTCA L Q R D L K R T V D A R L K L S	
	GAGGAATTGA GTGGTGGTAG ATTGAAGCCA AAACCTATTG ATGTACAAGT	1100
351	CTCCTTAACT CACCACCATC TAACTTCGGT TTTGGATAAC TACATGTTCA E E L S G G R L K P K P I D V Q V	
	CATTACACAC CACATGCAGC GATATGCAGT TTGGTTTGGA GGATCAATGC	1150
368	GTAATGTGTG GTGTACGTCG CTATACGTCA AACCAAACCT CCTAGTTACG I T H H M Q R Y A V W F G G S M L	
	TGGCTTCCAC GCTGAGTTC TACCAAGTAT GCCACACCAA AAAGGATTAT	1200
385	ACCGAAGGTG CGGACTCAAG ATGGTTTATA CGGTGTGGTT TTTCCTAATA A S T P E F Y Q V C H T K K D Y	
	GAAGAAATTG GACCTAGCAT TTGTCGTCAC AATCCAGTGT TTGGAGTCAT	1250
401	CTTCTTTAAC CTGGATCGTA AACAGCAGTG TTAGGTCACA AACCTCAGTA E E I G P S I C R H N P V F G V M	
	GTCTGTA	1257
418	CAGCATT S .	



## Anhang

### III. Arp2: 1185 nt; 394 As; MW=40,9 kDa; pI=6,56

	ATGGACAGCC	AGGGCAGGAA	GGTGGTGGTG	TGCGACAACG	GCACTGGGTT	50
	TACCTGTTCGG	TCCCGTCCCTT	CCACCACCAC	ACGCTGTITGC	CGTGACCCAA	
1	M D S Q	G R K	V V V	C D N G	T G F	
	TGTGAAGTGT	GGATATGCAG	GCTCTAACTT	TCCAGAACAC	ATCTTCCCAG	100
	ACACTTCACA	CCTATACGTC	CGAGATTGAA	AGGTCTTGTG	TAGAAGGGTC	
18	V K C	G Y A G	S N F	P E H	I F P A	
	CTTTGGTTGG	AAGACCTATT	ATCAGATCAA	CCACCAAAGT	GGGAAACATT	150
	GAAACCAACC	TTCTGGATAA	TAGTCTAGTT	GGTGGTTTCA	CCCTTTGTAA	
35	L V G	R P I	I R S T	T K V	G N I	
	GAAATCAAGG	ATCTCATGGT	TGGCGATGAG	GCAAGTGAGC	TGCGCTCCAT	200
	CTTTAGTTCC	TAGAGTACCA	ACCGCTACTC	CGTTCACTCG	ACGCGAGGTA	
51	E I K D	L M V	G D E	A S E L	R S M	
	GTTGGAGGTG	AACTACCCGA	TGGAGAACGG	CATCGTGC GC	AACTGGGACG	250
	CAACCTCCAC	TTGATGGGCT	ACCTCTTGCC	GTAGCACGCG	TTGACCCCTG	
68	L E V	N Y P M	E N G	I V R	N W D D	
	ACATGAAGCA	CCTGTGGGAC	TACACATTCT	GGCCAGAGAA	GCTCAATATA	300
	TGTACTTCGT	GGACACCCCT	ATGTGTAAAG	CCGGTCTCTT	CGAGTTATAT	
85	M K H	L W D	Y T F G	P E K	L N I	
	GACACCAGGA	GCTGCAAGAT	CTTACTTACA	GAACCCCCAA	TGAATCCAAC	350
	CTGTGGTCCT	CGACGTTCTA	GAATGAATGT	CTTGGGGGTT	ACTTAGGTTG	
101	D T R S	C K I	L L T	E P P M	N P T	
	CAAGAACAGA	GAGAAGATTG	TCGAGGTAAT	GTTTGAAACT	TACCAGTTTT	400
	GTTCTTGICT	CTCTTCTAAC	AGCTCCATTA	CAAACTTTGA	ATGGTCAAAA	
118	K N R	E K I V	E V M	F E T	Y Q F S	
	CTGGTGTGTA	TGTAGCCATC	CAAGCAGTTC	TGACTTTGTA	TGCTCAAGGT	450
	GACCACACAT	ACATCGGTAG	GTTCTGTCAAG	ACTGAAACAT	ACGAGTTCCA	
135	G V Y	V A I	Q A V L	T L Y	A Q G	
	TTACTGACTG	GTTGGTAGT	GGACTCTGGA	GATGGTGTCA	CTCACATTTG	500
	AATGACTGAC	CACACCATCA	CCTGAGACCT	CTACCACAGT	GAGTGTAAAC	
151	L L T G	V V V	D S G	D G V T	H I C	
	CCCAGTATAT	GAAGGCTTTT	CCCTCCCTCA	CCTTACAAGG	AGGCTGGATA	550
	GGGTCATATA	CTTCCGAAAA	GGGAGGGAGT	GGAATGTTCC	TCCGACCTAT	
168	P V Y	E G F S	L P H	L T R	R L D I	
	TTGCTGGGAG	GGATATTACC	AGGTATCTTA	TCAAGCTGCT	GCTGTTGCGA	600
	AACGACCCCT	CCTATAATGG	TCCATAGAAT	AGTTTCGACGA	CGACAACGCT	
185	A G R	D I T	R Y L I	K L L	L L R	
	GGATATGCCT	TCAACCATTG	TGCTGACTTT	GAGACAGTTC	GCATGATTAA	650
	CCTATACGGA	AGTTGGTAAG	ACGACTGAAA	CTCTGTCAAG	CGTACTAATT	
201	G Y A F	N H S	A D F	E T V R	M I K	

## Anhang

### III. Arp2: (Fortsetzung)

	AGAAAACTT	TGTTATGTGG	GTTACAATAT	TGAGCAAGAG	CAGAAGCTGG	700
	TCITTTTGAA	ACAATACACC	CAATGTTATA	ACTCGTTC	GTCTTCGACC	
218	E K L	C Y V G	Y N I	E Q E	Q K L A	
	CCTTAGAGAC	CACAGTGCTA	GTTGAGTCAT	ACACTCTTCC	AGATGGACGT	750
	GGAATCTCTG	GTGTCACGAT	CAACTCAGTA	TGTGAGAAGG	TCTACCTGCA	
235	L E T	T V L	V E S Y	T L P	D G R	
	ATTATTAAGG	TTGGAGGAGA	AAGATTGAA	GCACCAGAAG	CTTTATTTCA	800
	TAATAATTCC	AACCTCCTCT	TTCTAAACTT	CGTGGTCTTC	GAAATAAAGT	
251	I I K V	G G E	R F E	A P E A	L F Q	
	GCCTCATTTG	ATCAATGTTG	AGGGGGTGG	TGTTGCTGAA	TTGCTTTTTA	850
	CGGAGTAAAC	TAGTTACAAC	TCCCCCAACC	ACAACGACTT	AACGAAAAAT	
268	P H L	I N V E	G V G	V A E	L L F N	
	ACACAATCCA	GGCAGCCGAC	ATTGATACCA	GATCTGAATT	TTACAAGCAC	900
	TGTGTTAGGT	CCGTCCGCTG	TAACATATGGT	CTAGACTTAA	AATGTTCTGT	
285	T I Q	A A D	I D T R	S E F	Y K H	
	ATTGTGCTTT	CTGGAGGTTT	TACCATGTAT	CCTGGCCTGC	CATCGAGGTT	950
	TAACACGAAA	GACCTCCAAG	ATGGTACATA	GGACCGGACG	GTAGCTCCAA	
301	I V L S	G G S	T M Y	P G L P	S R L	
	GGAACGAGAG	CTTAAACAGC	TTTACCTAGA	ACGAGTTCTG	AAAGGAGATG	1000
	CCTTGCTCTC	GAATTTGTCT	AAATGGATCT	TGCTCAAGAC	TTTCCTCTAC	
318	E R E	L K Q L	Y L E	R V L	K G D V	
	TGGAGAACT	TTCGAAATTT	AAGATCCGCA	TTGAAGACCC	GCCTCGCAGG	1050
	ACCTCTTTGA	AAGCTTTTAA	TTCTAGGCGT	AACTTCTGGG	CGGAGCGTCC	
335	E K L	S K F	K I R I	E D P	P R R	
	AAGCACATGG	TGTTCTTGGG	TGGCGCAGTC	CTAGCAGACA	TCATGAAAGA	1100
	TTCTGTGTACC	ACAAGAACCC	ACCGCGTCAG	GATCGTCTGT	AGTACTTTCT	
351	K H M V	F L G	G A V	L A D I	M K D	
	CAAAGACAAC	TTCTGGATGA	CCAGACAAGA	GTACCAAGAA	AAGGGTGTCC	1150
	GTTTCTGTGT	AAGACCTACT	GGTCTGTCTT	CATGGTTCCT	TTCCACAGG	
368	K D N	F W M T	R Q E	Y Q E	K G V R	
	GTGTGCTGGA	GAAACTCGGT	GTGACTGTTC	GATAA		1185
	CACACGACCT	CTTTGAGCCA	CCTGACAAG	CTATT		
385	V L E	K L G	V T V R			

## Anhang

### IV. p41-Arc: 1119 nt; 372 As; MW=40,9 kDa; pI=8,34

	ATGGCCTACC	ACAGCTTCCT	GGTGGAGCCC	ATCAGCTGCC	ACGCCTGGAA	50											
	TACCGGATGG	TGTCGAAGGA	CCACCTCGGG	TAGTCGACGG	TGCGGACCTT												
1	M	A	Y	H	S	F	L	V	E	P	I	S	C	H	A	W	N
	CAAGGACCGC	ACCCAGATTG	CCATCTGCCC	CAACAACCAT	GAGGTGCATA	100											
	GTTCCTGGCG	TGGGTCTAAC	GGTAGACGGG	GTTGTTGGTA	CTCCACGTAT												
18	K	D	R	T	Q	I	A	I	C	P	N	N	H	E	V	H	I
	TCTATGAAAA	GAGCGGTGCC	AAATGGACCA	AGGTGCACGA	GCTCAAGGAG	150											
	AGATACTTTT	CTCGCCACGG	TTTACCTGGT	TCCACGTGCT	CGAGTTCCTC												
35	Y	E	K	S	G	A	K	W	T	K	V	H	E	L	K	E	
	CACAACGGGC	AGGTGACAGG	CATCGACTGG	GCCCCGAGA	GTAACCGTAT	200											
	GTGTTGCCCG	TCCACTGTCC	GTAGCTGACC	CGGGGCTCT	CATTGGCATA												
51	H	N	G	Q	V	T	G	I	D	W	A	P	E	S	N	R	I
	TGTGACCTGC	GGCACAGACC	GCAACGCCTA	CGTGTGGACG	CTGAAGGGCC	250											
	ACACTGGACG	CCGTGTCTGG	CGTTGCGGAT	GCACACCTGC	GACTTCCCGG												
68	V	T	C	G	T	D	R	N	A	Y	V	W	T	L	K	G	R
	GCACATGGAA	GCCCACGCTG	GTCATCCTGC	GGATCAACCG	GGCTGCCCGC	300											
	CGTGTACCTT	CGGGTGGGAC	CAGTAGGACG	CCTAGTTGGC	CCGACGGGCG												
85	T	W	K	P	T	L	V	I	L	R	I	N	R	A	A	R	
	TGCGTGGCGT	GGGCCCCCAA	CGAGAACAAG	TTTGCTGTGG	GCAGCGGCTC	350											
	ACGCACGCGA	CCCGGGGGTT	GCTCTTGTTC	AAACGACACC	CGTCGCGGAG												
101	C	V	R	W	A	P	N	E	N	K	F	A	V	G	S	G	S
	TCGTGTGATC	TCCATCTGTT	ATTTGAGACA	GGAGAATGAC	TGGTGGGTTT	400											
	AGCACACTAG	AGGTAGACAA	TAAAGCTCGT	CCTCTTACTG	ACCACCCAAA												
118	R	V	I	S	I	C	Y	F	E	Q	E	N	D	W	W	V	C
	GCAAGCACAT	CAAGAAGCCC	ATCCGCTCCA	CCGTCTCTCAG	CCTGGACTGG	450											
	CGTTCGTGTA	GTTCTTCCGG	TAGGCGAGGT	GGCAGGAGTC	GGACCTGACC												
135	K	H	I	K	K	P	I	R	S	T	V	L	S	L	D	W	
	CACCCCAACA	ATGTGCTGCT	GGCTGCCGGC	TCCTGTGACT	TCAAGTGTG	500											
	GTGGGGTTGT	TACACGACGA	CCGACGGCCG	AGGACACTGA	AGTTTACAGC												
151	H	P	N	N	V	L	L	A	A	G	S	C	D	F	K	C	R
	GATCTTTTCA	GCCTACATCA	AGGAGGTGGA	GGAACGGCCG	GCACCCACCC	550											
	CTAGAAAAGT	CGGATGTAGT	TCCTCCACCT	CCTTGCCGGC	CGTGGGTGGG												
168	I	F	S	A	Y	I	K	E	V	E	E	R	P	A	P	T	P
	CGTGGGGCTC	CAAGATGCCC	TTTGGGGAAC	TGATGTTTGA	ATCCAGCAGT	600											
	GCACCCCGAG	GTTCTACGGG	AAACCCCTTG	ACTACAAGCT	TAGGTGCTCA												
185	W	G	S	K	M	P	F	G	E	L	M	F	E	S	S	S	
	AGCTGCGGCT	GGGTACATGG	CGTCTGTTTC	TCAGCCAGCG	GGAGCCGCGT	650											
	TCGACGCCGA	CCCATGTACC	GCAGACAAAG	AGTCGGTTCG	CCTCGGCGCA												
201	S	C	G	W	V	H	G	V	C	F	S	A	S	G	S	R	V

## Anhang

### IV. p41-Arc: (Fortsetzung)

	GGCCTGGGTA	AGCCACGACA	GCACCGTCTG	CCTGGCTGAT	GCCGACAAGA	700
	CCGGACCCAT	TCGGTGCTGT	CGTGGCAGAC	GGACCGACTA	CGGCTGTTCT	
218	A W V	S H D S	T V C	L A D	A D K K	
	AGATGGCCGT	CGCGACTCTG	GCCTCTGAAA	CACTACCACT	GCTGGCGCTG	750
	TCTACCGGCA	GCGCTGAGAC	CGGAGACTTT	GTGATGGTGA	CGACCGCGAC	
235	M A V	A T L	A S E T	L P L	L A L	
	ACCTTCATCA	CAGACAACAG	CCTGGTGGCA	GCGGGCCACG	ACTGCTTCCC	800
	TGGAAGTAGT	GTCTGTTGTC	GGACCACCGT	CGCCCGGTGC	TGACGAAGGG	
251	T F I T	D N S	L V A	A G H D	C F P	
	GGTGCTGTTT	ACCTATGACG	CCGCCGCGGG	GATGCTGAGC	TTCGGCGGGC	850
	CCACGACAAG	TGGATACTGC	GGCGGCGCCC	CTACGACTCG	AAGCCGCCCC	
268	V L F	T Y D A	A A G	M L S	F G G R	
	GGCTGGACGT	TCCTAAGCAG	AGCTCGCAGC	GTGGCTTGAC	GGCCCGCGAG	900
	CCGACCTGCA	AGGATTGCTC	TCGAGCGTCG	CACCGAAGTG	CCGGGCGCTC	
285	L D V	P K Q	S S Q R	G L T	A R E	
	CGCTTCCAGA	ACCTGGACAA	GAAGCGGAGC	TCCGAGGGTG	GCACGGCTGC	950
	GCGAAGGTCT	TGGACCTGTT	CTTCCGCTCG	AGGCTCCAC	CGTGCCGACG	
301	R F Q N	L D K	K A S	S E G G	T A A	
	GGGCGCGGGC	CTAGACTCGC	TGCACAAGAA	CAGCGTCAGC	CAGATCTCGG	1000
	CCCGCGCCCG	GATCTGAGCG	ACGTGTTCTT	GTGCGAGTCG	GTCTAGAGCC	
318	G A G	L D S L	H K N	S V S	Q I S V	
	TGCTCAGCGG	CGGCAAGGCC	AAGTGCTCGC	AGTTCTGCAC	CACTGGCATG	1050
	ACGAGTCGCC	GCCGTTCCGG	TTCACGAGCG	TCAAGACGTG	GIGACCGTAC	
335	L S G	G K A	K C S Q	F C T	T G M	
	GATGGCGGCA	TGAGTATCTG	GGATGTGAAG	AGCTTGAGT	CAGCCTTGAA	1100
	CTACCGCCGT	ACTCATAGAC	CCTACACTTC	TCGAACCTCA	GTGCGAAGTT	
351	D G G M	S I W	D V K	S L E S	A L K	
	GGACCTCAAG	ATCAAATGAC				1120
	CCTGGAGTTC	TAGTTTACTG				
368	D L K	I K				

## Anhang

V. p34-Arc: 903 nt; 300 As; MW=34,3 kDa; pI=7,19

	ATGATCCTGC	TGGAGGTGAA	CAACCGCATC	ATCGAGGAGA	CGCTCGCGCT	50
	TACTAGGACG	ACCTCCACTT	GTGGCGTAG	TAGCTCCTCT	GCGAGCGCGA	
1	M I L L	E V N	N R I	I E E T	L A L	
	CAAGTTCGAG	AACGCGGCCG	CCGGAACAA	ACCGAAGCA	GTAGAAGTAA	100
	GTTCAAGCTC	TTGCGCCGGC	GGCCTTTGTT	TGGCCTTCGT	CATCTTCATT	
18	K F E	N A A A	G N K	P E A	V E V T	
	CATTTGCAGA	TTTCGATGGG	GTCCTCTATC	ATATTTCAAA	TCCTAATGGA	150
	GTAAACGTCT	AAAGCTACCC	CAGGAGATAG	TATAAAGTTT	AGGATTACCT	
35	F A D	F D G	V L Y H	I S N	P N G	
	GACAAAACAA	AAGTGATGGT	CAGTATTTCT	TTGAAATTCT	ACAAGGAACT	200
	CTGTTTGTGTT	TTCACTACCA	GTCATAAAGA	AACTTTAAGA	TGTTCCTTGA	
51	D K T K	V M V	S I S	L K F Y	K E L	
	TCAGGCACAT	GGTGCTGATG	AGTTATTAAA	GAGGGTGTAC	GGGAGTTTCT	250
	AGTCCGTGTA	CCACGACTAC	TCAATAATTT	CTCCACATG	CCCTCAAAGA	
68	Q A H	G A D E	L L K	R V Y	G S F L	
	TGGTAAATCC	AGAATCAGGA	TACAATGTCT	CTTTGCTATA	TGACCTTGAA	300
	ACCATTTAGG	TCTTAGTCCT	ATGTTACAGA	GAAACGATAT	ACTGGAACCT	
85	V N P	E S G	Y N V S	L L Y	D L E	
	AATCTTCCGG	CATCCAAGGA	TTCCATTGTG	CATCAAGCTG	GCATGTTGAA	350
	TTAGAAGGCC	GTAGGTTCTT	AAGGTAACAC	GTAGTTTCGAC	CGTACAACCT	
101	N L P A	S K D	S I V	H Q A G	M L K	
	GCGAAATTGT	TTTGCTCTGT	TCTTTGAAAA	ATACTTCCAA	TTCCAAGAAG	400
	CGCTTTAACA	AAACGGAGAC	AGAACTTTT	TATGAAGGTT	AAGGTTCTTC	
118	R N C	F A S V	F E K	Y F Q	F Q E E	
	AGGGCAAGGA	AGGAGAGAAC	AGGGCAGTTA	TCCATTATAG	GGATGATGAG	450
	TCCCGTTCCT	TCCTCTCTTG	TCCCGTCAAT	AGGTAATATC	CCTACTACTC	
135	G K E	G E N	R A V I	H Y R	D D E	
	ACCATGTATG	TTGAGTCTAA	AAAGGACAGA	GTCACAGTAG	TCTTCAGCAC	500
	TGGTACATAC	AACTCAGATT	TTTCTGTGCT	CAGTGTGATC	AGAAGTGTG	
151	T M Y V	E S K	K D R	V T V V	F S T	
	AGTGTTTAAG	GATGACGACG	ATGTGGTCAT	TGGAAAGGTG	TTCATGCAGG	550
	TCACAAATTC	CTACTGCTGC	TACACCAGTA	ACCTTTCCAC	AAGTACGTCC	
168	V F K	D D D D	V V I	G K V	F M Q E	
	AGTTCAAAGA	AGGACGCAGA	GCCAGCCACA	CAGCCCCACA	GGTCCTCTTT	600
	TCAAGTTTCT	TCCTGCGTCT	CGGTGCGTGT	GTCGGGGTGT	CCAGGAGAAA	
185	F K E	G R R	A S H T	A P Q	V L F	
	AGCCACAGGG	AACCTCCTCT	GGAGCTGAAA	GACACAGACG	CCGCTGTGGG	650
	TCGGTGTCCC	TTGGAGGAGA	CCTCGACTTT	CTGTGTCTGC	GGCGACACCC	
201	S H R E	P P L	E L K	D T D A	A V G	

## Anhang

---

### V. p34-Arc: (Fortsetzung)

	TGACAACATT	GGCTACATT	CCTTTGTGCT	GTTCCCTCGT	CACACCAATG	700
	ACTGTTGTAA	CCGATGTAAT	GGAAACACGA	CAAGGGAGCA	GIGTGGTTAC	
218	D N I	G Y I T	F V L	F P R	H T N A	
	CCAGTGCTCG	AGACAACACC	ATCAACCTGA	TCCACACGTT	CCGGGACTAC	750
	GGTCACGAGC	TCTGTTGTGG	TAGTTGGACT	AGGTGTGCAA	GGCCCTGATG	
235	S A R	D N T	I N L I	H T F	R D Y	
	CTGCACTACC	ACATCAAGTG	CTCTAAGGCC	TATATTCACA	CACGTATGCG	800
	GACGTGATGG	TGTAGTTTAC	GAGATTCCGG	ATATAAGTGT	GTCATACGC	
251	L H Y H	I K C	S K A	Y I H T	R M R	
	GGCGAAAACG	TCTGACTTCC	TCAAGGTGCT	GAACCGCGCA	CGCCCAGATG	850
	CCGCTTTTGC	AGACTGAAGG	AGTTCCACGA	CTTGGCGCGT	GCGGGTCTAC	
268	A K T	S D F L	K V L	N R A	R P D A	
	CCGAGAAAAA	AGAAATGAAA	ACAATCACGG	GGAAGACGTT	TTCATCCCGC	900
	GGCTCTTTTT	TCTTTACTTT	TGTTAGTGCC	CCTTCTGCAA	AAGTAGGGCG	
285	E K K	E M K	T I T G	K T F	S S R	
	TAA					903
	ATT					

## Anhang

### VI. p21-Arc: 537 nt; 178 As; MW=20,5 kDa; pI=8,6

	ATGCCGGCTT	ACCACTCTTC	TCTCATGGAT	CCTGATACCA	AACTCATCGG	50											
	TACGGCCGAA	TGGTGAGAAG	AGAGTACCTA	GGACTATGGT	TTGAGTAGCC												
1	M	P	A	Y	H	S	S	L	M	D	P	D	T	K	L	I	G
	AAACATGGCA	CTGTTGCCTA	TCAGAAGTCA	ATTCAAAGGA	CCTGCCCCCA	100											
	TTTGTACCGT	GACAACGGAT	AGTCTTTCAGT	TAAGTTTCTCT	GGACGGGGGT												
18	N	M	A	L	L	P	I	R	S	Q	F	K	G	P	A	P	R
	GAGAGACAAA	AGATACAGAT	ATTGTGGATG	AAGCCATCTA	TTACTTCAAG	150											
	CTCTCTGTTT	TCTATGTCTA	TAACACCTAC	TTCGGTAGAT	AATGAAGTTC												
35	E	T	K	D	T	D	I	V	D	E	A	I	Y	Y	F	K	
	GCCAAATGCT	TCTTCAAAAA	CTATGAAATT	AAGAATGAAG	CTGATAGGAC	200											
	CGGTTACAGA	AGAAGTTTTT	GATACTTTAA	TTCTTACTTC	GACTATCCTG												
51	A	N	V	F	F	K	N	Y	E	I	K	N	E	A	D	R	T
	CTTGATATAT	ATAACTCTCT	ACATTTCTGA	ATGTCTGAAG	AAACTGCAAA	250											
	GAAGTATATA	TATTGAGAGA	TGTAAAGACT	TACAGACTTC	TTTGACGTTT												
68	L	I	Y	I	T	L	Y	I	S	E	C	L	K	K	L	Q	K
	AGTGCAATTG	CAAAAGCCAA	GGTGAGAAAG	AAATGTATAC	GCTGGGAATC	300											
	TCACGTTAAG	GTTTTTCGGT	CCACTCTTTC	TTTACATATG	CGACCTTAG												
85	C	N	S	K	S	Q	G	E	K	E	M	Y	T	L	G	I	
	ACTAATTTTC	CCATTCTCTG	AGAGCCTGGT	TTTCCACTTA	ACGCAATTTA	350											
	TGATTAAAAG	GGTAAGGACC	TCTCGGACCA	AAAGGTGAAT	TGCGTTAAAT												
101	T	N	F	P	I	P	G	E	P	G	F	P	L	N	A	I	Y
	TGCCAAACCT	GCAAACAAAC	AGGAAGATGA	AGTGATGAGA	GCCTATTTAC	400											
	ACGGTTTGGA	CGTTTGTTTG	TCCTTCTACT	TCACTACTCT	CGGATAAATG												
118	A	K	P	A	N	K	Q	E	D	E	V	M	R	A	Y	L	Q
	AACAGCTAAG	GCAAGAGACT	GGACTGAGAC	TTTGTGAGAA	AGTTTTTGAC	450											
	TTGTGCGATT	CGTTCTCTGA	CCTGACTCTG	AAACACTCTT	TCAAAAGCTG												
135	Q	L	R	Q	E	T	G	L	R	L	C	E	K	V	F	D	
	CCTCAGAATG	ATAAACCCAG	CAAGTGGTGG	ACTTGCTTTG	TGAAGAGACA	500											
	GGAGTCTTAC	TATTTGGGTC	GTTCAACCACC	TGAACGAAAC	ACTTCTCTGT												
151	P	Q	N	D	K	P	S	K	W	W	T	C	F	V	K	R	Q
	GTTCAATGAAC	AAGAGTCTTT	CAGGACCTGG	ACAGTGA		537											
	CAAGTACTTG	TTCTCAGAAA	GTCCTGGACC	TGTCACT													
168	F	M	N	K	S	L	S	G	P	G	O	.					